Untersuchungen zur Differenzierung des Chloroplasten von Rhodella Violacea (Rhodophyceae) nach Stickstoffmangel

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

im

Fachbereich Biologie

der

Philipps-Universität Marburg/Lahn

Vorgelegt von

HERBERT SCHNEIDER

aus Dreis-Tiefenbach

Marburg/Lahn 1978

Druck: Mauersberger, Marburg

Untersuchungen zur Differenzierung des Chloroplasten von Rhodella Violacea (Rhodophyceae) nach Stickstoffmangel

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

im

Fachbereich Biologie

der

Philipps-Universität Marburg/Lahn

Vorgelegt von

HERBERT SCHNEIDER

aus Dreis-Tiefenbach

Marburg/Lahn 1978

Druck: Mauersberger, Marburg

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität
Marburg / Lahn als
Dissertation angenommen am : 24.7.1978
Tag der mündlichen Prüfung : 28.8.1978

Berichterstatter : Prof. Dr. W. Wehrmeyer
Mitberichterstatter : Prof. Dr. H. A. von Stosch

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. Werner Wehrmeyer, möchte ich für die Themenstellung, die stetige Diskussionsbereitschaft und Förderung der Arbeit an dieser Stelle herzlich danken.

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG

1.1. Einleitung 1
1.2. Zielsetzung 4

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Material 6
2.2. Anzucht und Kulturbedingungen 6
2.3. Einsatz von Antibiotika
2.3.1. Chloramphenicol 7
2.3.2. Cycloheximid 7
2.3.3. Lincomycin 7
2.3.4. D-MDMP 7
2.3.5. Rifampicin 8
2.3.6. Spectinomycin 8
2.4. Bestimmung des Pigmentgehaltes
2.4.1. Chlorophyll- und Carotinoidgehalt 9
2.4.2. Biliproteidgehalt 10
2.5. Absorptions- und Fluoreszenzemissionsspektren 11
2.6. Messung von Photosynthese, Hill-Reaktion und Atmung 12
2.7. Präparation für die Elektronenmikroskopie 15

3. EXPERIMENTELLE ERGEBNISSE

3.1. Elektronenmikroskopische Befunde zur Feinstruktur von Rhodella violacea aus Durchströmungskultur in Vollnährmedium
3.1.1. Allgemeine Charakterisierung der Zelle 17
3.1.2. Feinbau der Plastide und der Phycobilisomen 18
3.2. Elektronenmikroskopische Befunde zur Feinstruktur von Rhodella violacea nach 6-tägigem N-Mangel

3.2.1. Allgemeine Charakterisierung der Zelle 20
3.2.2. Feinbau der Plastide 21
3.3. Pigmentanalytische und funktionelle Daten zum N-Mangel 22
3.4. Elektronenmikroskopische Befunde zur Feinstruktur von Rhodella violacea in der Regenerationsphase
3.4.1. Allgemeine Charakterisierung der Zellen 24
3.4.2. Feinbau der Plastide und der Phycobilisomen 26
3.5. Pigmentanalytische- und funktionelle Daten zur Regeneration der Zellen nach N-Mangel 28
3.6. Bestandsaufnahme und Folgerungen 35
3.7. Untersuchungen zur Wirkung von Inhibitoren der Proteinsynthese an cytoplasmatischen Ribosomen auf die Regeneration von Rhodella nach N-Mangel
3.7.1. Elektronenmikroskopische Befunde zur Wirkung von Cycloheximid auf die Regeneration nach N-Mangel
3.7.1.1. Allgemeine Charakterisierung der Zelle 38
3.7.1.2. Feinbau der Plastide 39
3.7.2. Pigmentanalytische und funktionelle Daten zur Wirkung von Cycloheximid während der Regeneration 41
3.7.3. Elektronenmikroskopische, pigmentanalytische und funktionelle Befunde zur Wirkung von D-MDMP auf die Regeneration nach N-Mangel 43
3.8. Untersuchungen zur Wirkung von Inhibitoren der Proteinsynthese plastideneigener Ribosomen auf die Regeneration von Rhodella nach N-Mangel
3.8.1. Elektronenmikroskopische Befunde zur Wirkung von Chloramphenicol auf die Regeneration nach N-Mangel
3.8.1.1. Allgemeine Charakterisierung der Zelle 47
3.8.1.2. Feinbau der Plastide 47
3.8.2. Pigmentanalytische- und funktionelle Daten zur Wirkung von Chloramphenicol während der Regeneration 49
3.8.3. Pigmentanalytische- und funktionelle Daten zur Wirkung von Lincomycin und Spectinomycin während der Regeneration 58

3.8.4. Elektronenmikroskopische Befunde zur Wirkung von Lincomycin und Spectinomycin auf die Regeneration der Plastide nach N-Mangel 63

3.9. Untersuchungen zur Regeneration der Kulturen nach Entfernung der Antibiotika durch Waschung 65

3.10. Untersuchungen zur Wirkung von Inhibitoren der Proteinsynthese bei sukzessivem Einsatz 68

3.11. Untersuchungen zur Bedeutung der plastideneigenen DNA für die Regeneration von Rhodella nach N-Mangel

3.11.1. Pigmentanalytische Daten zur Wirkung von Rifampicin während der Regeneration 74

3.11.2. Elektronenmikroskopische Befunde zur Wirkung von Rifampicin auf die Regeneration nach N-Mangel 78

3.12. Untersuchungen zur Regeneration von Rhodella nach N-Mangel bei heterotropher Anzucht in Dunkelheit

3.12.1. Pigmentanalytische- und funktionelle Daten zur Regeneration der Zellen 84

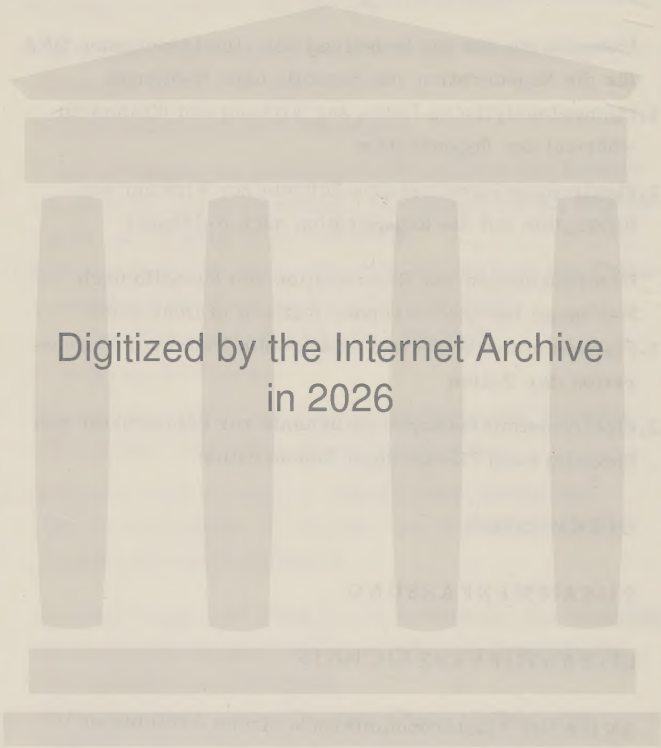
3.12.2. Elektronenmikroskopische Befunde zur Feinstruktur von Rhodella nach 72-stündiger Regeneration 91

4. DISKUSSION 93

5. ZUSAMMENFASSUNG 100

6. LITERATURVERZEICHNIS 104

7. ANHANG (Elektronenmikroskopische Abbildungen)



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546807_0035

1. EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG

1.1. Einleitung

Seit dem ersten Jahrzehnt dieses Jahrhunderts ist bekannt, daß Plastiden genetische Information enthalten. Die Versuche von Carl Correns an grün-weiß-gescheckten Linien der Wunderblume Mirabilis demonstrierten den selbständigen Erbgang der Plastiden. Das vom Zellkern unabhängige Erbgut der Plastiden hat von Otto Renner 1934 die Bezeichnung "Plastom" erhalten. Für die Chloroplasten wurde 1962 zum erstenmal gezeigt, daß sie neben DNA (Ris u. Plaut, 1962) auch Ribosomen enthalten (Lyttleton, 1962). Der hohe Anteil plastidärer Ribosomen an der gesamten Ribosomenmasse der photosynthetisch aktiven Zelle führte zu der Annahme einer Autonomie des Chloroplasten im Hinblick auf Synthese seiner eigenen Proteine. Versuche, Wachstum und Teilungsfähigkeit isolierter Chloroplasten in Kultur zu erhalten, schlugen hingegen fehl (Ridley u. Leech, 1970). Obwohl Chloroplasten die für eine Autonomie notwendigen vier Komponenten, DNA, DNA-Polymerase, RNA-Polymerase sowie eine proteinsynthetisierende Maschinerie enthalten, sind sie dennoch nicht in der Lage, alle Chloroplastenproteine zu codieren oder zu synthetisieren. Dies geht unter anderem daraus hervor, daß viele Faktoren im Zusammenhang mit der Chloroplastenstruktur und -Funktion mendelnd vererbt werden und daher diese Information wahrscheinlich im Kern zu lokalisieren ist (siehe Surzycki et al., 1970). Weiterhin gibt es zunehmend Gewißheit, daß die Hauptmenge der Chloroplastenproteine an cytoplasmatischen Ribosomen synthetisiert wird (Hoober, Siekevitz u. Palade, 1969; Hoober, 1970; Eytan u. Ohad, 1970; Ellis u. Hartley, 1971).
Die Differenzierung des Chloroplasten zu einem funktionsfähigen Organell muß daher als ein komplexes Wechselspiel zwischen Kern-DNA und cytoplasmatischen Ribosomen einerseits sowie Chloroplastengenom und plastideneigenen Ribosomen andererseits angesehen werden.
In den letzten Jahren ist die Frage nach den Determinanten von Chloroplastenstruktur und Funktion intensiv untersucht worden. Weitreichende

Ergebnisse wurden erzielt in Bezug auf die Synthese von löslichen- und Thylakoidmembranproteinen, wenn auch die Funktion der Syntheseprodukte für die überwiegende Zahl der Proteine noch ungeklärt ist. SDS-Gelelektrophoresen von Produkten der plastidären Proteinsynthese lieferten anfänglich nur wenige Polypeptide (Hoober, 1970; Machold u. Aurich, 1972; Eaglesham u. Ellis, 1974), nach Einsatz von Gradientengelen (Chua u. Bennoun, 1975) mit verbesserter Empfindlichkeit und Auflösung aber konnten viele kleinere Polypeptide zusätzlich analysiert werden (Morgenthaler u. Morgenthaler, 1976; Chua u. Gillham, 1977; Ellis, 1977). Als lösliches Produkt der Proteinsynthese von Chloroplasten konnte die große Untereinheit von Fraction I - Protein erkannt werden (Blair u. Ellis, 1973). Es handelt sich um das erste eindeutig identifizierte Polypeptid, welches an Chloroplasten-Ribosomen synthetisiert wird.

Ziel weiterer Untersuchungen war die Frage nach der Bedeutung der Proteinsynthese cytoplasmatischer und organelleneigener Ribosomen für die Formation funktionsfähiger Photosysteme und den diesen zugrundeliegenden Chlorophyll-Protein-Komplexen.

Für den Aufbau des Pigment-Protein-Komplexes I war schon früh vermutet worden, daß beide Proteinsyntheseorte notwendig sind (Machold u. Aurich, 1972), was durch Arbeiten von Börner et al. (1975) an Plastom- und Kernmutanten sowie durch Untersuchungen von Chua, Matlin u. Bennoun (1975) und Bar-Nun u. Ohad (1977) gestützt wird. Auch die Ausbildung eines voll funktionsfähigen Photosystem II - Komplexes wurde kürzlich als von beiden proteinsynthetisierenden Systemen abhängig beschrieben (Gurevitz, Kratz u. Ohad, 1977; Bar-Nun u. Ohad, 1977).

Zusätzliche Bedeutung der Chloroplastenribosomen ergibt sich im Hinblick auf Synthese von Proteinen des Calvin-Cyclus sowie des photosynthetischen Elektronentransportes (Smillie et al., 1967; Armstrong et al., 1971), der plastidären ATP-ase (Horak u. Hill, 1972; Morgenthaler, Morgenthaler u. Price, 1976; Ellis, 1977), Nitrit-Reduktase (Schrader, Beevers u. Hageman, 1967) sowie möglicherweise von einigen Polypeptiden ihrer eigenen Proteine, die Plastom codiert sind (Bogorad, 1975 a).

Die leichte Isolierung photosynthetisch aktiver Chloroplasten aus höheren Pflanzen hat dazu geführt, daß die Produkte plastidärer Protein-

synthese hier am besten untersucht sind. Daneben wurden als weitere bevorzugte Studienobjekte die volvocale Grünalge Chlamydomonas und vereinzelt Euglena-Arten eingesetzt. Vergleicht man die Produkte der Proteinsynthese von Chloroplasten aus Euglena (Vasconcelos, 1976) und Chlamydomonas (Chua u. Gillham, 1977) mit solchen aus höheren Pflanzen (Ellis, 1977), so tauchen im Detail Unterschiede auf. Die Übereinstimmungen sind aber so gravierend, daß mit einiger Sicherheit die Funktion der Chloroplasten-Ribosomen als universal und mit möglichen Einschränkungen als einheitlich angesehen werden kann.

Völlig offen ist bis heute die Frage nach der Bedeutung der Plastiden-DNA und der plastideneigenen Ribosomen für die Differenzierung solcher Chloroplasten geblieben, die sich morphologisch wie in der Pigmentkomposition völlig von dem bisher untersuchten nahezu einheitlichen Chloroplastentyp unterscheiden. So besitzen die Rhodophyceen neben Chlorophyll, Carotinen und Xanthophyllen mit den wasserlöslichen Biliproteiden zusätzliche Pigmente, die zuerst von Gantt u. Conti (1966 a) bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung der einzelligen Rotalge Porphyridium cruentum als granuläre Komponenten auf den stromaseitigen Thylakoidmembranoberflächen beschrieben wurden. Diese in vivo Aggregationsformen der Biliproteide haben die Bezeichnung Phycobilisomen erhalten (Gantt u. Conti, 1966 b).

Ein weiterer Unterschied zu den Verhältnissen bei Grünalgen und höheren Pflanzen ist das Fehlen von Granastrukturen im Thylakoidsystem der Rotalgenzelle. Vielmehr zeichnen sich die Chloroplasten der Rhodophyceen durch einzeln liegende und durchweg konzentrisch angeordnete Thylakoide aus.

Nachdem Wehrmeyer (1971) die einzellige bangiale Rotalge Rhodella violacea elektronenmikroskopisch charakterisiert hat und die Beschreibung der Zellorganisation durch eine eingehende Charakterisierung ihrer Biliproteide ergänzt worden ist (Koller u. Wehrmeyer, 1974), bleiben nach erfolgter Isolation und Charakterisierung der intakten Phycobilisomen dieser Art (Koller, Wehrmeyer u. Schneider, 1977) sowie der Klärung der Biliproteidanordnung innerhalb des Phycobilisoms (Mörschel et al.,1977) Fragen nach den Determinanten der Chloroplastenfeinstruktur und -ordnung einschließlich der Phycobili-

somen offen.
Diese komplexen Differenzierungsprozesse in ihren Grundzügen kennenzulernen, dient die vorliegende Arbeit.

1.2. Zielsetzung

Während für die Bildung der chromophoren Gruppen der Biliproteide detailierte Untersuchungen vorliegen (Troxler u. Bogorad, 1966; Troxler u. Brown, 1970, 1975; Troxler, 1972), stehen Untersuchungen zur Lokalisation der subzellulären Proteinbildungsorte noch aus. Es wurde daher mit der vorliegenden Arbeit u.a. der Versuch unternommen, die Bedeutung der cytoplasmatischen wie der plastidären Ribosomen für die Apoproteinbildung dieser Chromoproteide zu erfassen. Gleichzeitig wurde die Frage nach der Lokalisation der genetischen Information für die Biliproteidbildung gestellt.
Da Pigmentbildung und -Akkumulation eng verbunden sind mit Differenzierungsprozessen der Trägerstrukturen, die während der Entwicklung und unter verschiedenen physiologischen Bedingungen einem im Elektronenmikroskop faßbaren Formwechsel unterliegen (Wehrmeyer, 1966), erschien es sinnvoll, die pigmentanalytischen Daten mit feinstrukturellen Befunden zu korrelieren. Diese betreffen sowohl die Thylakoide wie auch die Phycobilisomen selbst.

- Einen methodischen Ansatz zu entwickeln, der bei der Chloroplastendifferenzierung in Bezug auf Pigment- und Feinstrukturanalytik reproduzierbare Ergebnisse liefert und auch spezifische Veränderungen registriert, war die erste Zielsetzung dieser Arbeit.

Zur Lokalisation der Proteinbildungsorte bzw. der genetischen Information für bestimmte Komponenten stehen grundsätzlich verschiedene Ansätze zur Verfügung. Eine erste Möglichkeit besteht darin, solche Organismen zu untersuchen, deren Fähigkeit zur Ausführung der Proteinsynthese in der Plastide durch eine Mutation verloren gegangen ist. Eine weitere elegante Methode ist die Analyse der Produkte der Proteinsynthese isolierter, intakter Chloroplasten, Etioplasten oder deren Lysate, bzw. der Einsatz der aus den Chloroplasten fraktionier-

ten mRNA's in heterologen proteinbildenden Systemen in vitro. Da für das Rotalgensystem in Bezug auf die Fragestellung keine Mutanten zur Verfügung stehen und eine Isolierung intakter Chloroplasten aufgrund ihrer lappigen Gestalt bis heute nicht gelungen ist, bot sich als Methode der Einsatz spezifischer Inhibitoren der Transscription und Translation in vivo an, die in der Lage sind, selektiv plastidäre Informationsübertragung bzw. Proteinsynthese an cytoplasmatischen und plastideneigenen Ribosomen zu blockieren.

- Die Wirkung von Antibiotika, welche sich im Einsatz bei höheren Pflanzen und Grünalgen bewährt haben, auf Pigmentsynthese und Erhaltungszustand von Chloroplastensubstrukturen des Rotalgensystems zu testen, war daher zweite Zielsetzung der Arbeit.

Verbunden mit dem Einsatz von Antibiotika sind oft Sekundäreffekte, die nicht als solche erkannt zu Defekten führen, welche nur schwer zu interpretierende Resultate liefern. Gravierend sind dabei vor allem Veränderungen im mitochondrialen Bereich, die zur Blockierung der Zellatmung führen können.

- Dritte Zielsetzung war daher, die mit dem Antibiotika-Einsatz verbundenen Änderungen der mitochondrialen Atmungskapazität der Zelle zu registrieren. Vergleiche der Atmungswerte mit den Photosyntheseraten liefern ein Maß für den Erhaltungszustand der Organellen. Weiterhin galt es, die Überlebensfähigkeit der Zellen nach Antibiotika-Einsatz zu überprüfen.

Der Einfluß von Licht auf die Biliproteid-Produktion ist für Cyanidium caldarium und Tolypothrix tenuis intensiv untersucht worden. Hierbei ergaben sich erhebliche Unterschiede. Während die Blaualge in der Lage ist, unter bestimmten Bedingungen in Dunkelheit komplette Biliproteide zu synthetisieren (Hattori u. Fujita, 1959; Fujita u. Hattori, 1960), vermag die Rotalge nach Fütterung mit Aminolävulinsäure nur die entsprechenden Chromophoren zu bilden (Troxler u. Bogorad, 1966). Untersuchungen an Rhodella violacea in Bezug auf diese Punkte sollten daher dazu beitragen, die offene Frage zu überprüfen, ob die unterschiedliche Befähigung zur Biliproteidsynthese in Abhängigkeit von Licht diese beiden systematischen Gruppen voneinander trennt.

- Die vierte Zielsetzung bestand daher darin, die Fähigkeit auch von

Rhodella violacea zur Phycobilin- und Phycobiliproteid-Synthese unter dunkel-heterotrophen Bedingungen zu testen, sowie bei vorliegender Biliproteidsynthese die Fähigkeit des neugebildeten Materials zum Energietransfer zu untersuchen.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Material

Für die vorliegenden Untersuchungen wurde Rhodella violacea (Kornmann) comb. nov. (Wehrmeyer, 1971) aus Nachzuchten authentischen Materials verwendet.

2.2. Anzucht und Kulturbedingungen

Die Anzucht von Rhodella violacea erfolgte in Durchströmungskulturen wie bei Koller u. Wehrmeyer (1974) beschrieben. Bei Erreichen einer Zellzahl von etwa 3×10^6 Zellen/ml wurden die Algen in Kulturröhren mit frischer Nährlösung übertragen. Das Wachstum in dem künstlichen Seewassermedium wurde optimiert durch Zusatz von Vitaminen ($2{,}76 \times 10^{-4}$ u Mol/l Vitamin B_{12}, $1{,}28 \times 10^{-2}$ u Mol/l Vitamin B_1 und $1{,}24 \times 10^{-2}$ u Mol/l Biotin.
Zur Induktion des Stickstoffmangels wurde das in der normalen Vollnährlösung enthaltene Kaliumnitrat durch eine äquimolare Menge an Kaliumchlorid ersetzt. Als einzige im Nährmedium verbleibende Stickstoffquelle könnte das zur Pufferung in geringem Umfang zugesetzte TRIS (hydroxy-methyl) aminomethan angesehen werden. Nach Angaben von Wiedeman (1964) auf Grund seiner Untersuchungen an 19 verschiedenen Grünalgen kann jedoch TRIS als mögliche N-Quelle als ausgeschlossen betrachtet werden.

Beim Ansatz der heterotrophen Kultur wurden die Zellen in lichtundurchlässigen Kulturröhren mit Glycin oder D-Glucose als Kohlenstoff-

quelle in der Konzentration von 10 g/l versorgt. Die Begasung erfolgte sowohl mit 2% CO_2 in Luft als auch mit CO_2 - freier Atmosphäre (Reinheit 0,7 VpM).

Zum Wechsel der Nährmedien wurden die Algen niedertourig bei 2800 U/min (Junior III der Fa. Christ, Osterode) abzentrifugiert, 2-3 mal im Folgemedium gewaschen und dann im gleichen Medium resuspendiert. Bei all diesen Arbeitsgängen wurde auf die Einhaltung steriler Bedingungen soweit wie nur irgend möglich geachtet.

Beim Ansatz der Stickstoff-Mangelkultur wurden die Zellen in einer Dichte von $1,5 \times 10^6$ Zellen/ml angeimpft, während alle folgenden Experimente mit einer Zellkonzentration von 1×10^6 Zellen/ml gestartet wurden.

2.3. Einsatz von Antibiotika

Bei allen Experimenten wurden die Antibiotika zwei Stunden nach Einsetzen der Lichtperiode appliziert. Stets erfolgte die Zugabe der Antibiotika-Lösungen zum Nährmedium vor der Übertragung der gewaschenen Zellen.

2.3.1. Chloramphenicol (Boehringer Mannheim GmbH) wurde in sterilem, destilliertem Wasser bis zu einer Endkonzentration von 2 mg/ml gelöst. Diese lichtempfindliche Stammlösung wurde bei $4^{\circ}C$ in Dunkelheit aufgehoben. Im Experiment wurden Konzentrationen von 2,5 ug/ml bis 200 ug/ml getestet.

2.3.2. Cycloheximid (Boehringer Mannheim GmbH) wurde ebenfalls in sterilem, destilliertem Wasser gelöst. Die Stammlösung enthielt 1 mg/ml. Im Experiment wurden Konzentrationen von 1 ug/ml und 2 ug/ml eingesetzt.

2.3.3. Lincomycin wurde als Probe von der Upjohn Company (Kalamazoo, Mich., USA) geliefert. Vor jedem Einsatz wurde eine frische wäßrige Lösung angesetzt. Die getesteten Konzentrationen lagen in der Spanne von 50 ug/ml bis 300 ug/ml.

2.3.4. Das D-Isomer von 2-(4-methyl-2,6-dinitroanilino)-N-methylpropionamid (D-MDMP) wurde von Dr. R. Baxter der Shell AG kosten-

los zur Verfügung gestellt. Das Antibiotikum wurde in Methanol gelöst und als 0,4 %-ige methanolische Lösung im Experiment eingesetzt. Die gleiche Menge Methanol wurde der Kontrolle zugesetzt. Konzentrationen von 10^{-5} M bis 4 x 10^{-5} M wurden getestet (Absorption der MDMP-Lösung siehe in Fig.1).

2.3.5. Rifampicin (Produkt der Fa. Lepetit, Mailand, Italien über Boehringer, Mannheim) ist in Wasser praktisch unlöslich. Es wurde daher in Methanol gelöst und als 0,8 %-ige methanolische Lösung in Konzentrationen von 1 ug/ml bis 250 ug/ml im Experiment eingesetzt. Die Lösungen wurden vor jedem Einsatz jeweils frisch angesetzt und sofort verwendet. Die Kontrolle enthielt die entsprechende Menge Methanol. Armstrong et al. (1971) erhöhten die Lichtintensität bei Rifampicin-Experimenten gegenüber der Kontrolle wegen der Eigenabsorption dieses Stoffes. Wie das Absorptionsspektrum einer Rifampicinprobe in Fig.1 zeigt, liegt das Absorptionsmaximum bei 470 nm. Das erste Maximum der Absorption durch Phycoerythrin hingegen liegt im in vivo Spektrum bei 545 nm, wo Rifampicin nur minimale Absorption zeigt. Bei der nachgewiesenen Parallelität von photosynthetischer Aktivität und Biliproteidabsorption verschieden pigmentierter Rot- und Blaualgen (Haxo u. Blinks, 1950; Duysens, 1952; Haxo u. Norris, 1953; Yokum u. Blinks, 1954; Airth u. Blinks, 1956) ist die Eigenabsorption von Rifampicin ohne Bedeutung, so daß auf eine Steigerung der Lichtintensität verzichtet wurde. Galling, Salzmann u. Spieß (1973), die Rifampicin in einer Anfangskonzentration von 100 ug/ml einsetzten, fügten aufgrund einer eventuellen Zersetzung während längerer Anzucht nach jeweils 24 Stunden weitere 50 ug/ml des Antibiotikums zu. Wie nach eigenen Untersuchungen zu beobachten war, wird die Rifampicin-Absorption im Maximum bei 470 nm nach 56-stündigem Einsatz nur um 3% reduziert. Eine zusätzlich Applikation im Verlauf des Experiments erschien daher nicht notwendig.

2.3.6. Spectinomycin in Form des Dihydrochlorid-pentahydrats wurde als "Trobicin" von der Upjohn Company (Kalamazoo, Mich., USA) zur Verfügung gestellt. Gleichfalls eingesetzt wurde der unter der Bezeichnung "Stanilo" auf dem klinischen Markt erhältliche chemisch gleiche Wirkstoff. "Stanilo" wird in der medizinischen Therapie gegen Gonorrhöe verwendet. Die wäßrigen Lösungen dieser Salze wurden vor

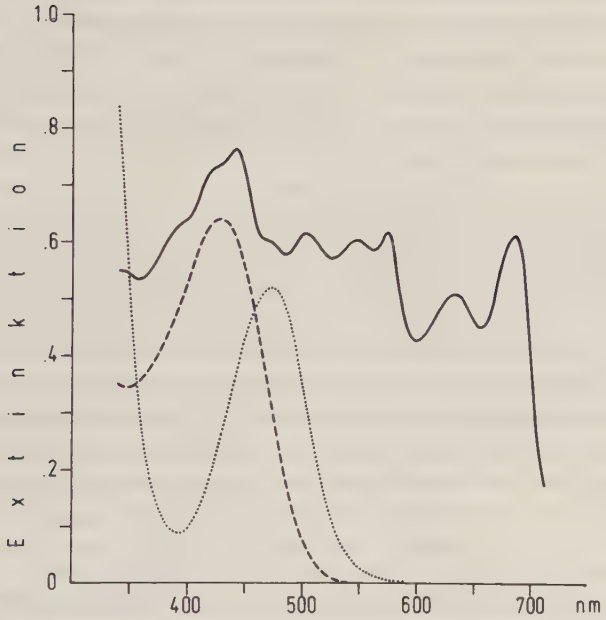


Fig.1 Absorptionsspektrum ganzer Zellen von Rhodella violacea in Nährmedium suspendiert (———). Absorption von MDMP (- - - -) und Rifampicin (•••••••) in Nährmedium nach Lösung in Methanol.

dem Einsatz mit NaOH auf pH 7,1 titriert. Spectinomycin-dihydrochlorid-pentahydrat wie zusätzlich auch Spectinomycin-sulfat (ebenfalls von Upjohn Company) wurden im Konzentrationsbereich von 10 ug/ml bis 300 ug/ml eingesetzt. Dabei sind die Konzentrationen der Menge an Spectinomycin-Base äquivalent.

2.4. Bestimmung des Pigmentgehaltes

2.4.1. Chlorophyll- und Carotinoidgehalt: Chlorophyll a und die Carotinoide wurden nach Zentrifugation einer definierten Menge Zellsuspen-

sion mit bekannter Zellzahl durch wiederholte Behandlung mit siedendem Methanol extrahiert. Um dabei eine Umwandlung von Chlorophyll in Phaeophytin zu verhindern, wurde dem Methanol eine Spatelspitze Magnesiumcarbonat zugesetzt. Die Konzentration von Chlorophyll a wurde ermittelt durch Messung der Extinktion bei 665 nm und Berechnung des Absolutwertes unter Verwendung des spezifischen Absorptionskoeffizienten von Mac Kinney (1941).

Die Gesamtmenge an Carotinen und Xanthophyllen wurde aus den gleichen methanolischen Extrakten nach der Formel von Röbbelen (1957), mit den Korrekturen von Metzner et al. (1965) bestimmt.

Die Ermittlung der Zellzahl der Suspensionen wurde mittels einer Zählkammer (Thoma-neu) vorgenommen. Eine Anreicherung auf der Basis des sogenannten "packed cell volume" (PCV) erschien ungeeignet, da die untersuchte Rotalge keine Zellwand besitzt und daher leicht deformierbar ist. Weiterhin wird bei der starken Schleimbildung der Alge die Bestimmung auf der Basis zentrifugierter Zellen ungenau.

2.4.2. Biliproteidgehalt: Versuche, den Biliproteidgehalt nach Aufschluß der Zellen durch Ultraschallbehandlung zu ermitteln, hatten nur begrenzten Erfolg. Unvollständiger Zellaufschluß und nicht quantitative Freisetzung der Pigmente führten zu einem relativen prozentualen Fehler, der größer war als die z.T. geringen Änderungen des Pigmentgehaltes. Die quantitative Bestimmung der einzelnen Biliproteide erfolgte daher durch Auswertung der Absorptionsspektren ganzer Zellen, aufgenommen nach der Methode von Shibata (1959) unter Verwendung der spezifischen Absorptionskoeffizienten von 5,58 für Phycoerythrin (gesamt), 5,51 für Phycocyanin und 5,74 für Allophycocyanin. Zur Vereinfachung der Auswertung wurden die Extinktionswerte bei 542, 628 und 655 nm ermittelt, welche die jeweiligen Maxima der Pigmente im in vivo Spektrum repräsentieren.
Die Verschiebung der Wellenlängen und die spektrale Überlappung mit Begleitpigmenten machten eine Korrektur der früher publizierten Formeln (Koller, Wehrmeyer u. Schneider, 1977) notwendig. Die Ermittlung der quantitativen Biliproteidverteilung wurde nach folgenden Gleichungen vorgenommen (Koller unveröffentlicht).

$$C_{PE} = \left[\left(E_{542} - 0{,}185\, E_{628} + 0{,}016\, E_{655} \right) / 5{,}58\right] \times 1{,}422$$

$$C_{PC} = \left[\left(1{,}055\, E_{628} - 0{,}688\, E_{655} \right) / 5{,}51\right] \times 1{,}331$$

$$C_{APC} = \left[\left(1{,}055\, E_{655} - 0{,}091\, E_{628} \right) / 5{,}74\right] \times 0{,}317$$

Der unterschiedliche Gehalt an extraplastidärer Rotalgenstärke in den vermessenen Kulturen führte durch veränderte Lichtstreuung bei der Aufnahme von Absorptionsspektren ganzer Zellen zu einer linearen Erhöhung aller Absorptionswerte. Diese lineare Erhöhung der Absorptionswerte wurde korrigiert durch Subtraktion des bei 740 nm gemessenen Wertes der stärkeführenden Zellsuspension. Vergleichende Messungen des Chlorophyllgehaltes aus Spektren ganzer Zellen und nach methanolischer Extraktion bestätigen die Richtigkeit der auf dieser Basis vorgenommenen Korrektur.

2.5. Absorptions- und Fluoreszenzemissionsspektren

Die Absorptionsspektren ganzer Zellen wurden mit einem Shimadzu Zweistrahlphotometer Mod. MPS-50L in OS-Cuvetten von 1 cm Schichtdicke aufgenommen. Als Referenz diente das jeweilige Nährmedium der Kultur.
Zur Messung der Fluoreszenzemissionspektren ganzer Zellen wurde ein Rechteck-Fluorometer des Physikalisch-Chemischen Institutes der Universität Marburg verwendet. Lichtquelle: Quecksilberlampe HBO 200 W-2 der Fa. Osram. Anregungs- und Emissionsmonochromator: Bausch u. Lomb Mod. 33-68-40. Photomultiplier: S-20 Kathode 9659 B der Fa. EMI-Electronics, Hayes, England. Betrieb bei konstanter Temperatur von $-30^{\circ}C$.
Zellsuspensionen mit einer Zellzahl von 12×10^6 Zellen/ml wurden in 0,2 cm Quarz-Cuvetten bei 545 nm angeregt. Bei Zusatz von DCMU (2×10^{-4}M) betrug die Einwirkungszeit exakt 10 Minuten. Die erhaltenen Fluoreszenzemissionsspektren wurden korrigiert und anschließend normiert.
Alle Absorptions- und Fluoreszenzemissionsspektren wurden bei Zimmertemperatur aufgenommen.

2.6. Messung von Photosynthese, Hill-Reaktion und Atmung

Die Messung des bei der Photosynthese und der Hill-Reaktion entwickelten, bzw. bei der Atmung aufgenommenen Sauerstoffs erfolgte polarographisch in einem "Gilson-Oxygraphen" (Gilson Medical Electronics, Middleton, Wisconsin; Techmation, Düsseldorf) mit einer stationären Micro-Clark-Elektrode. Die Platin-Silber Einstabelektrode wurde durch eine sauerstoffdurchlässige Teflonmembran von der Testsuspension getrennt.
Der Gilson Oxygraph mißt bei konstanter Polarisationsspannung (-0,8V) die durch die Erhöhung bzw. Erniedrigung der Sauerstoffkonzentration hervorgerufene Stromänderung.
Die Registrierung erfolgte durch einen Schreiber auf Millimeterpapier bei einem Vorschub von 1 mm/sec. Der Tangens der Kurven ist der Änderung der Sauerstoffkonzentration direkt proportional. Als Reaktionsgefäß diente eine 2 ml Flüssigkeit fassende Glaskammer, die ihrerseits von einem Glasmantel umgeben ist, welcher die Umspülung der Reaktionskammer mit temperaturkonstantem Wasser ($20^{o}C$) erlaubt. Zur Konstanthaltung der Temperatur wurde ein Lauda-Ultrakryomat (Lauda, Modell TK 300) benutzt. Ein Micromagnetrührer sorgte für eine stetige Umwälzung der Algensuspension, sodaß eine Sedimentation der Algen während der Messung vermieden und gleichzeitig eine beschleunigte Verteilung der gelösten Gase erreicht werden konnte (siehe Senger, 1970 a).
Die polarographischen Messungen erfolgten an Suspensionen mit der gleichen Zellzahl von $1,5 \times 10^{7}$ Zellen/ml, die sich in Vorversuchen als günstig erwiesen hatte. Dazu wurden die Zellzahlen der Ausgangssuspensionen bestimmt (Thoma-neu), die Algen durch Zentrifugation sedimentiert und anschließend durch Zugabe von Nährmedium auf das erforderliche Volumen gebracht.
Die Lichtintensität bei der Bestimmung der Photosynthesekapazität und der Hill-Reaktion (Belichtung durch Projektor -Prado Universal- mit Vorsatz-Sammellinse) lag im Lichtsättigungsbereich (Fig.2) und betrug an der Stelle der Reaktionskammer $6,3 \times 10^{5}$ erg/ cm^{2} x sec für Rotlicht wie für Weißlicht. Das Rotlicht wurde durch Einbringen eines oberhalb 620 nm durchlässigen Plexiglasfilters in den Strahlengang erzeugt. Rotlichtmessungen wurden durchgeführt, um bei Photosynthese-

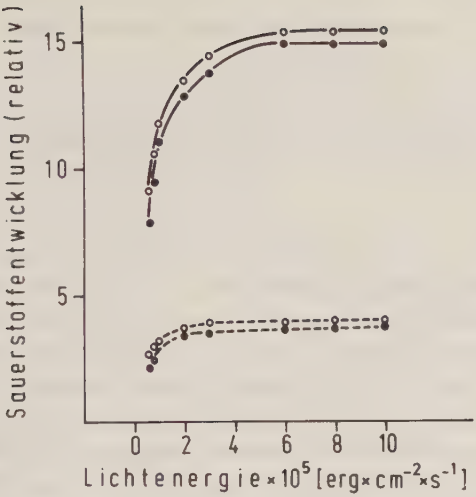


Fig.2 Dosiseffektkurven der Sauerstoffentwicklung gemessen an Kulturen von Rhodella mit 1,5 x 10^7 Zellen/ml Nährmedium in Abhängigkeit von verschiedenen Lichtintensitäten. Das obere Kurvenpaar repräsentiert die Verhältnisse in der Normalkultur, die gestrichelten Linien die der 6-tägigen N-Mangelkultur. Bei 6,3 x 10^5 erg/cm^2 x sec ist Lichtsättigung erreicht. Die geschlossenen Punkte entsprechen Werten nach Belichtung mit Rotlicht, die offenen solchen nach Weißlichtbestrahlung.

messungen eine mögliche Atmungssteigerung durch den Blaulichtanteil des Weißlichtes (Kowallik, 1967; Kowallik u. Gaffron, 1967; Pickett u. French, 1967) zu verhindern. Während die Photosynthesekapazität im Weißlicht und im Rotlicht ermittelt wurde, blieb die Bestimmung der Hill-Reaktion auf Rotlicht beschränkt, um durch kürzerwellige Strahlung hervorgerufene Photopolymerisation des als Hill-Reagens verwendeten Parabenzochinons zu verhindern.

Seit der Entdeckung, daß p-Benzochinon als Elektronenakzeptor in ganzen Algenzellen fungieren kann (Clendenning u. Ehrmantraut, 1950), ist

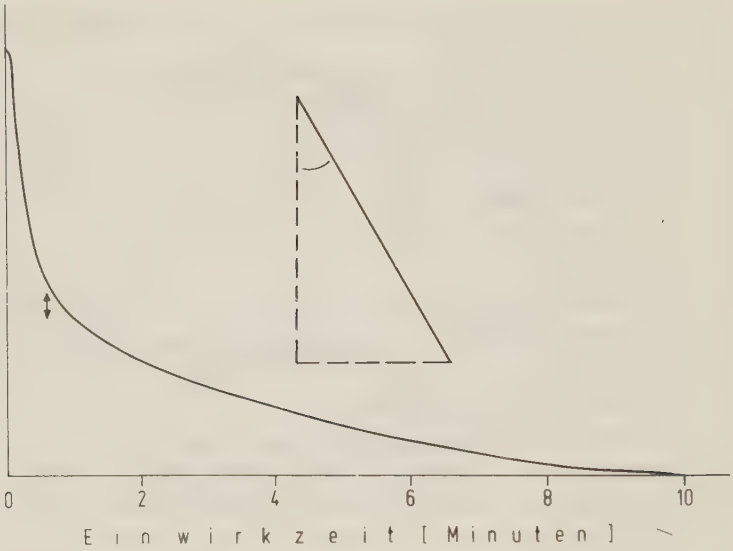


Fig.3 Änderung der Sauerstoffaufnahme bei Einwirkung von p-Benzochinon auf ganze Zellen von Rhodella violacea. Der Neigungswinkel der durchgezogenen Linie in der zentralen Graphik gibt das Maß der Sauerstoffaufnahme der Zellen vor Applikation von p-Benzochinon an und dient als Bezugsgröße. Nach anfänglich gesteigerter Sauerstoffaufnahme wird bei ↕ der Wert der normalen Atmung erreicht. Nach 10 Minuten ist keine Atmung mehr registrierbar.

auch bekannt geworden, daß Nebeneffekte in Form von zunehmender Permeabilität des Plasmalemma mit seiner Wirkung verbunden sind. Bei der chemischen Reaktion, wahrscheinlich mit Proteinen (Gimmler u. Avron, 1971), handelt es sich vermutlich um die Bildung von 1,4-Additionsprodukten mit Amino- oder Schwefelwasserstoffgruppen der Zellproteine (Morrison, Steele u. Danner, 1969; Gimmler u. Avron, 1971) und kann daher mit der vernetzenden Wirkung von Formaldehyd verglichen werden (Hallier u. Park, 1969).

Zur Messung der Hill-Reaktion wurden 0,4 ml einer Lösung von 2 mg

p-Benzochinon/ml aqua-bidest als Hill-Reagens zur Suspension zugesetzt. Dies entspricht einer Endkonzentration von $3,7 \times 10^{-3}$ Mol/l.

Da die Atmung durch p-Benzochinon unterbunden wird, ist deren Veränderung in Abhängigkeit von der Einwirkungszeit ein gutes Maß für die Permeation des Stoffes über die Hüllmembranen. Wie Fig.3 zeigt, ist nach einer Einwirkungszeit des p-Benzochinons von 10 Minuten keinerlei Atmung mehr festzustellen.

Während der photosynthetischen Sauerstoffentwicklung laufen gleichzeitig die Prozesse der Atmung ab, bei denen Sauerstoff verbraucht wird. Bei der verwendeten Meßmethode besteht experimentell keine Möglichkeit, die Sauerstofffreisetzung gleichzeitig mit dem Sauerstoffverbrauch zu messen. Aus diesem Grunde wurde vor und nach jeder Belichtung bei Dunkelheit der durch die Atmung hervorgerufene Sauerstoffverbrauch gemessen und der so ermittelte Wert bei der Auswertung der Kurven der Sauerstoffentwicklung hinzugerechnet. Bei der Hill-Reaktion ist eine Korrektur der gemessenen Sauerstofffreisetzung nicht nötig, weil wie erwähnt die Atmung durch p-Benzochinon vergiftet wird.

Die Clark-Elektrode, die in ihrer Sauerstoffempfindlichkeit im Bereich von 20-30°C nahezu linear temperaturempfindlich ist, wurde bei 20°C (Meßtemperatur) mit luftgesättigtem Wasser calibriert. Bei der Auswertung der Kurven konnte daher als Bezugswert die Eichgröße 285 uMol O_2 / l zugrundegelegt werden (Estabrook, 1967; Lessler, 1972).

2.7. Präparation für die Elektronenmikroskopie

Zur elektronenmikroskopischen Präparation wurden die Algen nach Zentrifugation bei 2800 U/min und mehrmaligem Waschen in 0,1 m Phosphatpuffer (im folgenden P.P.) pH 6,8 unter Zusatz von 0,25 Mol/l Saccharose in 4% ige Glutaraldehydlösung überführt (G.A.-Lsg. in 0,1 m P.P. pH 6,8 + 0,25 Mol/l Saccharose). Bei Zellen aus Antibiotika-Kulturen wurden mehrere Waschungen mit Nährmedium vorgeschaltet, um das Antibiotikum vollständig zu entfernen. Die Fixierung erfolgte bei Zimmertemperatur (20°C) für 2 Std. unter einmaligem Wechsel des Fixiermittels. Nach vier Waschungen im gleichen Puffer mit abnehmender Rohrzuckerkonzentration wurde die Nachfixierung mit 1% OsO_4 in 0,1 m P.P. pH 6,8 für 2 Std. bei gleicher Temperatur vorgenommen.

Nach Alkoholentwässerung und Imprägnierung erfolgte die Einbettung in Epon 812 nach Luft (1961). Die Ultradünnschnitte wurden am Ultramikrotom Ultrotome III der Fa. LKB-Producter (Stockholm, Schweden) unter Verwendung eines Diamantmessers hergestellt. Nach doppelter Kontrastierung in methanolischem Uranylacetat und Bleicitrat nach Stempak u. Ward (1964) wurden die Schnitte im Elmiskop IA der Fa. Siemens oder im Elektronenmikroskop 301 G der Fa. Philips im Feinstrahl unter Verwendung der Objektraumkühlung untersucht.

3. EXPERIMENTELLE ERGEBNISSE

Auf der Suche nach einem Ausgangsstadium zur Untersuchung von Pigmentbildungs- und Chloroplastendifferenzierungsprozessen waren Arbeiten von Interesse, die von einem durch Stickstoffmangel induzierten Pigmentabbau berichten.
Schon 1910 beobachtete Boresch einen dramatischen Farbwechsel in einer Kultur von Oscillatoria als Folge von Stickstoffmangel. Er bezeichnete dieses Phänomen als "Nitrogen chlorosis". Folgende Arbeiten von Magnus u. Schindler (1912) und Boresch (1913) setzten diesen Farbwechsel in Beziehung zum Gehalt an Pigmenten wie Chlorophyll und Phycobiliproteiden. Neuere Arbeiten an Grünalgen belegten eine starke Abnahme von Chlorophyll bei Stickstoffentzug (Aach, 1953; Mayer u. Czygan, 1969; Weber, 1975)..
Für Rotalgen liegen ebenfalls, wenn auch spärlich, Angaben zum Stickstoffhaushalt vor. Diese beziehen sich zunächst auf die nutzbaren N-Quellen (Birdsey u. Lynch, 1962; Fries, 1963) oder unterstreichen die Unentbehrlichkeit von Stickstoff für die Chlorophyll- und Biliproteidbildung (Haxo u. Strout, 1950;Fujita u. Hattori, 1960; Gantt u. Conti, 1966 a; Troxler u. Bogorad, 1966; Guerin - Dumartrait, Leclerc u. Hoarau, 1973).
Ein künstlich induzierter Stickstoffmangel in einer Kultur von Rhodella violacea sollte daher ebenfalls Zellen mit stark reduziertem Pigmentgehalt liefern. Als äußerst interessant muß dabei die Korrelation zwischen Feinstruktur der Chloroplastenkomponenten und dem jeweiligen Pigmentgehalt der Kulturen angesehen werden. Vergleiche sind dabei in Bezug auf Zellen der Durchströmungskultur in Vollnährmedium vorzunehmen.

3.1. Elektronenmikroskopische Befunde zur Feinstruktur von Rhodella violacea aus Durchströmungskultur in Vollnährmedium

3.1.1. Allgemeine Charakterisierung der Zelle: Der prinzipielle Aufbau der Zelle von Rhodella violacea wurde von Wehrmeyer (1971) beschrieben. Die Charakterisierung der Biliproteide dieser Art machte eine Massenanzucht der Alge notwendig, wobei unter den Bedingungen der

Durchströmungskultur das Nährmedium abgewandelt wurde (Koller u. Wehrmeyer, 1974). Diese Veränderungen führten zu einem Anstieg des Gehaltes an extraplastidärer Rotalgenstärke sowie einer Reduktion des Anteils der peripheren Plastidenteile am Gesamtvolumen der Zelle. Diese für eine feinstrukturelle Zellanalyse nachteilige Verschiebung der plasmatischen Anteile zugunsten der Reservestoffe konnte bei gleichzeitig deutlicher Steigerung des Zellwachstums durch Zugabe von Vitaminen zum Nährmedium teilweise wieder kompensiert werden (siehe Material u. Methoden). Gleichzeitig veränderte sich das Bild der Zelle in charakteristischer Weise (Wehrmeyer u. Schneider, 1975).

Der mediane Querschnitt durch die einzellige marine Rotalge Rhodella violacea aus einer Durchströmungskultur in Vollnährmedium in Abb.1 (siehe elektronenmikroskopische Aufnahmen im Anhang) demonstriert diese Verhältnisse. Zu den Veränderungen gehören die stärkere Vakuolenbildung und die Abnahme der Stärkespeicherung. Bemerkenswert ist ferner die unter diesen Ernährungsbedingungen deutlich werdende Zunahme des relativen Flächenanteils der stark gelappten Plastide.

3.1.2. Feinbau der Plastide und der Phycobilisomen: Hier sollen zwei spezielle Befunde etwas näher betrachtet werden, da sie im Hinblick auf die später folgende Darstellung der Abwandlung der Feinstruktur der Plastide unter der Belastung des N-Mangels eine Rolle spielen. Der erste betrifft die Thylakoidanordnung in den peripheren Plastidenteilen, der zweite die Phycobilisomen selbst.
Die Plastidenteile weisen unter den offensichtlich optimalen Wachstumsbedingungen eine Vielzahl von einzeln liegenden, äquidistanten Thylakoiden vollbesetzt mit Phycobilisomen auf, wobei lokal besonders dichte Thylakoidlagen mit hoher Ordnung in der Phycobilisomenverteilung auffallen. Diese besonders eng liegenden Thylakoide zeigen senkrechte Entfernungen voneinander von 29-40 nm und lassen daher sehr knapp eine alternierende Anordnung der Phycobilisomen auf parallel benachbart liegenden Thylakoiden zu (Abb.4). Die dominierenden Thylakoidentfernungen in geordneten Plastidenteilen liegt bei 52-67 nm. Der von den Thylakoiden meist nicht eingenommene zentrale Bereich der Plastidenteile ist matrixerfüllt und enthält deutlich sichtbar fibrilläre Elemente der Plastiden-DNA (Abb.2) sowie Plastidenribosomen (Abb.4). Stets zur Ober-

fläche der Algenzelle hin orientiert und vielfach dicht unter der Chloroplastenhülle liegend sind in Gruppen osmiophile Globuli nachweisbar (Abb.1).
Was die Phycobilisomen selbst anbelangt, so sind feinstrukturelle Angaben über Dimensionen in der Literatur nur spärlich vorhanden, da ihre Erhaltung bei der elektronenmikroskopischen Präparation schwierig ist. Mit der vorliegenden Untersuchung gelang es, durch eine optimale Fixierung und gute Kontrastierung Einzelaspekte von Phycobilisomen und die sekundär sich davon ableitenden Aggregationsformen in vivo über z.T. größere Thylakoidbereiche hinweg darzustellen.

Abhängig von der zufälligen Schnittführung durch die Zelle können im elektronenmikroskopischen Bild drei verschiedene Aspekte der Phycobilisomen gezeigt werden. Schnitte parallel zur Thylakoidoberfläche (Abb.2) demonstrieren die Scheibchennatur der Phycobilisomen. Sie stehen senkrecht auf den Thylakoidmembranen und sind in parallelen Reihen säulen- oder geldrollenartig angeordnet mit nur geringen Entfernungen voneinander. Schnitte senkrecht zur Thylakoidoberfläche können wiederum senkrecht oder parallel zu den einzelnen Scheibchen verlaufen. Für den ersten Fall ergeben sich Profilansichten (Abb.3), wobei der Kontakt des Scheibchens mit dem Thylakoid klar zutage tritt. Im zweiten Fall werden Flächenansichten der Phycobilisomen erkennbar (Abb.4). Die Flächenansichten lassen rundliche Gebilde erkennen, die an ihrer Basis abgeflacht auf dem Thylakoid aufsitzen. Das einzelne Phycobilisom zeigt keine scharfe kreisförmige Begrenzung, vielmehr können wulstförmige Ausbuchtungen erkannt werden (Abb.4). Das Phycobilisomenmodell in Abb.5 kombiniert alle drei Aspekte. Die Dimensionen der Flächenansicht des Phycobilisoms können durch die Längen der beiden ungleichen Achsen angegeben werden. Die längere Achse entlang der Basis des Phycobilisoms mißt 36-40 nm, die kürzere, welche die senkrechte Entfernung angibt, mißt 29-33 nm. Die Dicke eines einzelnen Phycobilisoms beträgt ca. 6,5 nm. Die mittlere Entfernung zweier Phycobilisomenreihen von Zentrum zu Zentrum beträgt 45 nm.

3.2. Elektronenmikroskopische Befunde zur Feinstruktur von Rhodella violacea nach 6-tägigem N-Mangel

3.2.1. Allgemeine Charakterisierung der Zelle: Ein Vergleich der im medianen Querschnitt größengleich dargestellten Zellen aus dem Vollnährmedium (Abb.1) und der N-Mangelkultur (Abb.6.) zeigt die tiefgreifenden Veränderungen, die mit dem Nitratmangel eintreten. Um dem nur visuellen Eindruck der elektronenmikroskopischen Bilder eine quantitative Grundlage zu verleihen, wurden median geschnittene, vergleichbare Zellen der Einbettungsserien aus der Vollnährlösung und der N-Mangelkultur planimetrisch ausgewertet. Über die sich dabei ergebenden Flächenanteile der einzelnen Zellbestandteile gibt die folgende Übersicht in abgerundeten Prozentzahlen Auskunft.

	Zellkern	Plastide+ Pyrenoid	Stärke	Vakuole	Cytoplasma
Normalkultur	9%	40%	6%	20%	25%
6-tägige N-Mangelkultur	5%	15%	18%	43%	19%

Meßtechnisch ergaben sich die Werte für den cytoplasmatischen Anteil der Zelle als Differenzbetrag aus der Gesamtfläche und der Summe der Einzelbestimmungen der übrigen Zellbestandteile. Wenngleich die Auswertung von Ultradünnschnitten in der vorgenommenen Weise bestimmte methodische Probleme grundsätzlicher Art aufwirft (Chayes, 1965; Loud, Barany u. Pack, 1965; Weibel, 1969), scheint die in den Zahlenangaben deutlich werdende Tendenz repräsentativ zu sein und gestattet folgende Aussagen.

Verbunden mit dem 6-tägigen N-Mangel sind eine relative Größenabnahme des Zellkerns und eine extreme Größenabnahme der peripheren Plastidenteile bei vergleichsweise geringer Veränderung des Pyrenoids festzustellen. Besonders auffällig sind die Zunahme des Anteils extraplastidärer Rotalgenstärke und die Ausdehnung von Zellsaftvakuolen, die zusammen zum dominierenden Anteil der Gesamtzelle unter den Bedingungen des N-Mangels werden, während der Flächenanteil des Cyto-

plasmas schwindet. Eine gewisse Zunahme erfahren auch lipophile Zelleinschlüsse, die in der Flächenangabe des Cytoplasmas mit enthalten, aber nicht gesondert aufgeführt sind.

3.2.2. Feinbau der Plastide: Angesichts der Befunde, daß die Chloroplasten aus Blättern höherer Pflanzen zwischen 30 und 60% des Gesamtzellproteins ausmachen können (Heber, 1960; Zucker u. Stinson, 1962; Nickel, 1968), erscheinen die drastischen Veränderungen in der Plastide auch bei Rotalgen verständlich.
Die oben beschriebene flächenmäßige Reduktion des Plastidenanteils innerhalb der Gesamtzelle kann verstanden werden als der Ausdruck eines starken Proteinabbauprozesses, der primär den Matrixanteil, dann aber auch die Phycobilisomen und die Thylakoide selbst betrifft (Abb.7). Der größte Teil der Thylakoide ist nach völligem Schwund der Phycobilisomen kollabiert. Darüber hinaus ist durch die Schrumpfung der peripheren Plastidenteile infolge von Matrixverlusten der verbleibende Raum für die Thylakoide so weit reduziert, daß sie unter diesen Verhältnissen gewunden verlaufen und auch den normalerweise weitgehend ausgesparten zentralen Bereich der Plastidenteile erfüllen. Der dabei freibleibende Matrixbereich der Plastide ist mit Chloroplastenribosomen angefüllt.
Die kollabierten Thylakoide bilden lokal in unregelmäßigen Abständen durch Zusammenlagerung von Thylakoidmembranen Kontaktzonen aus, was zur Steigerung des Kontrastes führt. Sie verlaufen im übrigen in geringen Abständen zueinander, die mit Werten zwischen etwa 2 und 7,5 nm bestimmt wurden. Die in den elektronenmikroskopischen Bildern von Plastiden aus N-Mangelkulturen deutlich erkennbare Kontrastzunahme auch von kollabierten Thylakoiden ohne Kontaktzonen gegenüber den Einzelthylakoiden ungeschädigter Plastidenteile wird also offensichtlich nicht nur durch die Ausbildung solcher Kontaktzonen hervorgerufen, sondern ist auf ein verändertes färberisches Verhalten zusätzlich zurückzuführen. Die Ursache hierfür mag in einem zugunsten des Lipidanteils verschobenen Protein-Lipid-Verhältnis gesehen werden.

Während sich jedoch bei Anabaena cylindrica bereits nach 6 Tagen Anzucht im Medium nach Allen u. Arnon (1955) unter Ausschluß von N_2 und Begasung mit H_2 und 5% CO_2 eine phycocyaninfreie Kultur erzielen

ließ (van Gorkom u. Donze, 1971), sind bei Rhodella violacea auch nach 6-tägigem Stickstoffmangel immer noch intakte Plastidenbereiche mit normaler Thylakoidanordnung und normalem Phycobilisomenbesatz vorhanden, wenn auch in einem völlig untergeordneten Anteil (Abb.8). Die intakten Thylakoide liegen dabei stets randlich, während die durch Stickstoffmangel geschädigten Thylakoide im zentralen Matrixbereich kollabiert sind.
Die Thylakoidabstände in diesen intakten Bereichen stimmen mit Werten zwischen 29 und 40 nm völlig mit denen dichter Thylakoidanordnung aus Vollnährmedium-Kulturen überein.
Auch die Phycobilisomen in den intakten Plastidenbereichen zeigen die gleiche Anordnung und Musterbildung wie in Normalkulturen. Auswertungen eines repräsentativen Querschnitts von elektronenmikroskopischen Aufnahmen der N-Mangelkultur lieferten Werte für die Phycobilisomendimensionen, die mit denen aus der Kultur in Vollnährmedium exakt übereinstimmen. Wichtig erscheinen diese Befunde insofern, als nicht auf Kosten eines quantitativen Abbaus von Phycobilisomen andere Zellbestandteile erhalten werden, sondern komplette Teile des Photosyntheseapparates bewahrt werden.
Parallel durchgeführte spektralphotometrische Messungen an Zellsuspensionen aus N-Mangelkulturen zeigten trotz der völligen Farbverschiebung von rotbraun nach gelbgrün stets einen Restanteil an Biliproteiden, so daß hier strukturelle und spektralanalytische Daten sich bestätigen.
Während somit in den peripheren Plastidenteilen gravierende Veränderungen nachzuweisen sind, scheint das mehr zentralständige Pyrenoid, dessen Proteinnatur von verschiedenen Autoren angegeben wird (Griffiths, 1970; Brown u. Arnott, 1970), in dem hier betrachteten Zeitraum von 6 Tagen N-Mangel keinen elektronenmikroskopisch erkennbaren Veränderungen zu unterliegen.

3.3. Pigmentanalytische und funktionelle Daten zum N-Mangel

Um die mit dem 6-tägigen Stickstoffmangel eingetretenen feinstrukturellen Veränderungen mit dem Gehalt an Pigmenten sowie der funktionellen Leistungsfähigkeit der Organellen vergleichen zu können, wurden Pigmentanalysen durchgeführt sowie die photosynthetische Sauer-

stoffentwicklung und die mitochondriale Atmung gemessen. Die N-Mangelkultur ist mit folgenden Prozentwerten in Bezug auf die Normalkultur zu charakterisieren.

Pigmentgehalt:		Leistungsfähigkeit:	
Chlorophyll a	3o%	Photosynthese	24%
Phycoerythrin ges.	25%	Hill-Reaktion	27%
Phycocyanin	29%	Atmung	62%
Allophycocyanin	32%		
Carotinoide	37%		

Verbunden mit dem N-Mangel ist eine Reduktion des Chlorophyllgehaltes um 70%. Auch die Biliproteide werden etwa im gleichen Maße abgebaut, wobei der Phycoerythringehalt auf 25%, der Phycocyanin- und der Allophycocyaningehalt auf ca. 30% der Normalkultur reduziert wird.

Ebenso erfahren auch die Carotinoide eine mengenmäßige Reduktion, ihr Gehalt wird um über 60% vermindert.

Der gegenüber den anderen Biliproteiden etwas bevorzugte Abbau des Phycoerythrins ist reproduzierbar und mag damit zu begründen sein, daß in Übergangsbereichen von kollabierten- und strukturell erhaltenen Thylakoiden die Peripherie der Phycobilisomen zuerst angegriffen wird, während die inneren Komponenten noch konserviert werden. Für eine solche Vermutung spricht der Befund, daß in elektronenmikroskopischen Aufnahmen die Phycobilisomen in solchen Übergangsbereichen kleiner sind, was ihre Ausdehnung in der zum Thylakoid senkrechten Achse anbelangt (Abb.9). Mörschel et al. (1977) konnten vor kurzem zeigen, daß die Peripherie des Phycobilisoms von Rhodella violacea aus Dreiereinheiten aufgebaut ist, bestehend aus Phycoerythrin und Phycocyanin im Verhältnis 2:1, wobei aus funktionellen Erwägungen die Phycoerythrin-Komponenten außen lokalisiert sein dürften.

Vergleicht man die pigmentanalytischen Daten mit den Befunden zur photosynthetischen Leistungsfähigkeit der Plastiden, so steht einer

durchschnittlich 70%-igen Reduktion des Pigmentgehaltes eine Abnahme der Photosynthesekapazität um ca. 75% gegenüber.
Auch die Hill-Reaktion, die mit p-Benzochinon als Hill-Reagens an ganzen Zellen gemessen wurde und die als ein Maß für reine Photosystem II-Leistung angesehen werden kann (Bishop, 1964; Senger, 1970 b; Saha et al., 1971), wobei das p-Benzochinon im Plastochinonpool angreift (Frickel-Faulstich, 1974), liegt mit einer Absenkung um 75% im gleichen Rahmen.
Während große Teile des Photosyntheseapparates der Zelle nach 6-tägigem N-Mangel geschädigt werden, was sowohl den Verlust von Phycobilisomen als auch eine Destruktion des Thylakoidsystems betrifft, bleiben kleinere Bereiche der Plastide strukturell erhalten. Wegen der guten Übereinstimmung der pigmentanalytischen und funktionellen Ergebnisse kann daher angenommen werden, daß nur diese ungeschädigten Plastidenteile photosynthetisch aktiv sind.

Eine Ausnahme von den obigen Befunden machen die Mitochondrien, deren Kapazität zur Veratmung von O_2 nur um ca. 40% reduziert ist. In der Tabelle auf Seite 20 nicht besonders aufgeführt, aber eindeutig zu belegen ist eine Größenzunahme einzelner Mitochondrien, die auch durch eine reichliche Ausbildung von Binnenstrukturen hervortreten (Abb.10). Die Mitochondrien werden also während der Abbauvorgänge unter N-Mangel gegenüber anderen Zellorganellen konserviert.

3.4. Elektronenmikroskopische Befunde zur Feinstruktur von Rhodella violacea in der Regenerationsphase

3.4.1. Allgemeine Charakterisierung der Zellen: Um die Veränderungen nach Rücküberführung der Zellen der N-Mangelkultur in das Vollnährmedium zu erfassen, wurden zwei Stadien der Regenerationsphase (8- und 48 Std.) planimetrisch ausgewertet. Die dabei erhaltenen prozentualen Flächenanteile der einzelnen Zellbestandteile sind nachfolgend den Werten gegenübergestellt, die für die Normal- und 6-tägige N-Mangelkultur ermittelt wurden (S: 20).

	Zellkern	Plastide+ Pyrenoid	Stärke	Vakuole	Cytoplasma
Normalkultur	9%	40%	6%	20%	25%
6-tägige N-Mangelkultur	5%	15%	18%	43%	19%
Regeneration (8h)	7%	27%	14%	34%	18%
Regeneration (48h)	9%	42%	8%	17%	24%

Wie aus dieser Übersicht über die prozentualen Flächenanteile der Zellbestandteile hervorgeht, nehmen nach offensichtlich erfolgter Neubildung von Proteinen besonders die peripheren Plastidenteile und das Cytoplasma, geringfügig auch der Zellkern anteilsmäßig zu. Die während des Stickstoffmangels akkumulierte Florideenstärke wird abgebaut und die Zellsaftvakuolen werden reduziert. Auffällig ist die schon nach 8-stündiger Regeneration nahezu verdoppelte Fläche des relativen Anteils der Plastide. Diese ist nach 48 Stunden vollständig regeneriert.
Die Fähigkeit des Thylakoidsystems, nach den drastischen Veränderungen unter Nitratmangel vergleichsweise rasch zu regenerieren, gehört zu den bemerkenswerten Befunden der vorliegenden Untersuchung. Dabei erweist sich der Ablauf der Regeneration nicht als unmittelbare Umkehr der Abbauvorgänge, sondern läßt einen schubweise erfolgenden Verlauf erkennen (s.u.).

Verbunden mit der Regenerationsphase und mit der Dauer der Regeneration zunehmend kann eine Anhäufung von fibrillärer Substanz in Vakuolen des Cytoplasmas beobachtet werden (Abb.11), welche mit der äußeren Schleimhülle identisch zu sein scheint. Oft benachbart zu solchen Vakuolen liegen Dictyosomen in aktiver Phase der Sekretion. Die gleiche Beobachtung machten Gantt, Edwards u. Conti (1968) bei Porphyridium aerugineum. Evans et al. (1974) fanden durch Untersuchungen an Rhodella maculata, daß der Schleim im Golgi-Apparat gebildet und in Form voluminöser Vakuolen zur äußeren Cytoplasmamembran transportiert und dort ausgeschleust wird.
Eine Korrelation zwischen Abbau der unter Nitratmangel gespeicherten

Florideenstärke und dem Ausschleusen von polysaccharidhaltigem Material kann vermutet werden.

3.4.2. Feinbau der Plastide und der Phycobilisomen: Auf Grund elektronenmikroskopischer Bilder von Zellen nach verschiedenen Regenerationszeiten in Vollnährmedium, von denen hier exemplarisch das 8-, 24- und 48 Std.-Stadium ausgewählt wurden, läßt sich der Prozeß der Regeneration des Thylakoidsystems in wenigstens zwei aufeinanderfolgende Entwicklungsphasen aufgliedern.
1. Die Wiederherstellung distinkter Thylakoidmembranen und die darauf folgende Neuordnung der Thylakoide in äquidistanten Schichten, und
2. die Regeneration der Phycobilisomen mit ihrem typischen Verteilungsmuster auf der Thylakoidoberfläche.

Die in den folgenden Ausführungen zur Korrelation mit bestimmten Regenerationszeiten herangezogenen elektronenmikroskopischen Bilder stellen einen repräsentativen Querschnitt vergleichbarer Zellen der verschiedenen Einbettungsserien dar.

Die Abb.12 zeigt einen Ausschnitt aus einer Plastide nach 8-stündiger Regeneration in Vollnährmedium. Übereinstimmend mit dem Zustand des 6-tägigen N-Mangels in Abb.7 sind der gewundene Thylakoidverlauf und die Kontrastunterschiede innerhalb der Thylakoidmembranen. Diese erweisen sich in den flächenmäßig ausgedehnten Teilen schwächer, in den mehr tordierten Teilen stärker elektronenstreuend. Deutliche Unterschiede ergeben sich beim Vergleich der Thylakoiddarstellung und -ordnung. Durch offensichtlich gewellte Oberflächenausbildung der Thylakoide stellen sich diese in den N-Mangelstadien selten in distinkten Profilansichten dar. Vielmehr sind sie überwiegend tangential oder schräg getroffen, was einen "verwaschenen" Aspekt ergibt (Abb.7). Die Thylakoide aus der 8-stündigen Regenerationsphase hingegen lassen sich in klaren Profilansichten darstellen (Abb.12), was auf die Wiederherstellung planer Oberflächen schließen läßt. Messungen an zahlreichen Aufnahmen aus dieser Phase 8-stündiger Regeneration ergaben senkrechte Entfernungen zwischen den Thylakoidmembranen von 3,5-8 nm. Diese Werte sind also nur geringfügig von denen verschieden, die lokal an kollabierten Thylakoiden aus dem N-Mangelstadium beobachtet wurden.

Ein wesentlich veränderter Gesamtaspekt ergibt sich jedoch dadurch, daß die Kontakte der Thylakoidmembranen untereinander aufgehoben sind. Die einen Stapel oben und unten begrenzenden Thylakoide nehmen sogar lokal schon wieder etwas größere Abstände vom nächst benachbarten Thylakoid ein, was als ein Schritt in Richtung auf die Neuordnung der Thylakoide in parallelen Schichten mit einem größeren Abstand voneinander angesehen werden kann. Für das 8-Std.-Stadium der Regeneration ist jedoch die deutliche räumliche Trennung der Thylakoide voneinander unter Wiederherstellung planer Oberflächen als charakteristisch anzusehen, während die verstärkte Tendenz zum Auseinanderweichen nach ca. 16-stündiger Regeneration erkennbar wird.

Aufgrund der starken Volumenzunahme der Plastide ergibt sich insgesamt eine den Matrixanteil betreffende Kontrastabnahme durch den Verdünnungseffekt elektronenstreuender Partikel wie besonders der Ribosomen. Gleichzeitig aber werden bedingt durch den gleichen Effekt die fibrillären Elemente der DNA-Zentren der Plastide wieder deutlich sichtbar (Z).

Geht man vom Stadium 8-stündiger Regeneration auf das 24-Std.-Stadium der Abb.13 über, so findet man bereits eine gewisse Annäherung an den Ausgangszustand der Normalkultur vor. Sie vermittelt einen Eindruck vollständig entfalteter Thylakoide mit Entfernungen von 29 bis 40 nm voneinander, wie für eine neuerliche Belegung mit Phycobilisomen als Minimum zu fordern. In den mehr randlichen Thylakoidlagen dieses Plastidenteils sind Biliproteidaggregate in Form typischer Phycobilisomen vorhanden, die den N-Mangelzustand überdauert haben dürften. Die zentral liegenden Thylakoide, die aufgrund ihres wellenförmigen Verlaufs als regeneriert anzusprechen sind, weisen hingegen zu diesem Zeitpunkt noch nicht wieder Phycobilisomen in ihrer typischen Anordnung auf. Lokal aber sitzen den Thylakoiden granuläre Komponenten an, die aufgrund ihrer regelmäßigen Abstände möglicherweise mit "wachsenden" Phycobilisomen identisch sind.

Die bisher stets unentschiedene Frage, inwieweit die Phycobilisomen selbst als Ursache für den äquidistanten Thylakoidverlauf verantwortlich zu machen sind, kann somit eindeutig dahingehend entschieden werden, daß sich die Neuordnung der Thylakoide ohne ihr Vorhandensein vollzieht.

Nach 48-stündiger Regeneration findet man bereits eine weitgehende Annäherung an den Ausgangszustand der Normalkultur vor (Abb.14). Die reorganisierten Thylakoide zeigen in den vermessenen Anordnungen überwiegend Abstände zwischen 30 und 45 nm, während weiter entfernte Thylakoidlagen noch fehlen. Im Gegensatz zum 24-Std.-Stadium sind aber nunmehr auch die Phycobilisomen neugebildet. Diese zeigen in den überwiegenden Fällen eine Höhe von 25 nm und eine Basislänge von ca. 40 nm. Die bis zu diesem Zeitpunkt regenerierten Phycobilisomen sind also im Mittel um ca. 5 nm kleiner als die Phycobilisomen der Normalkultur, während die Werte an der Basis übereinstimmen. Auch die Dicke der Einzelscheibchen liegt mit ca. 6,5 nm im Rahmen des Normalfalls.
Die in den randlichen Thylakoidlagen ungeschädigter Plastidenbereiche der N-Mangelkultur zunächst größenunverändert überdauernden Phycobilisomen unterliegen während der Regeneration einer deutlichen Veränderung. Diese Phycobilisomen zeigen nach 48-stündiger Regeneration mit ca. 40 nm keine Veränderung in der Breite, weisen aber mit einer Höhe von ca. 25 nm etwa die Dimensionen der neugebildeten Phycobilisomen auf. Es drängt sich daher die Vermutung auf, daß zum Aufbau neuer Phycobilisomen nicht nur die mit der Regeneration angelieferten Proteinsyntheseprodukte verwendet werden, sondern möglicherweise gleichfalls Biliproteidkomponenten bestehender Phycobilisomen zur Komplettierung anderer Verwendung finden. Für diese Vermutung sprechen die Photosynthesemessungen an Zellen nach 24-stündiger Regeneration (siehe 3.5.).

3.5. Pigmentanalytische- und funktionelle Daten zur Regeneration der Zellen nach N-Mangel

Parallel zu den feinstrukturellen Veränderungen werden nach Überführung der Zellen in stickstoffhaltiges Medium nach Anlauf der Proteinbildungsprozesse auch die Photosynthesepigmente neu synthetisiert. Der Anstieg des Chlorophyll- sowie des Biliproteidgehaltes während 72-stündiger Regeneration ist in Fig.4 graphisch dargestellt.Nach 8-stündiger Regeneration konnten nur Spuren von neugebildetem Pigmentmaterial nachgewiesen werden. Wie aus elektronenmikroskopischen

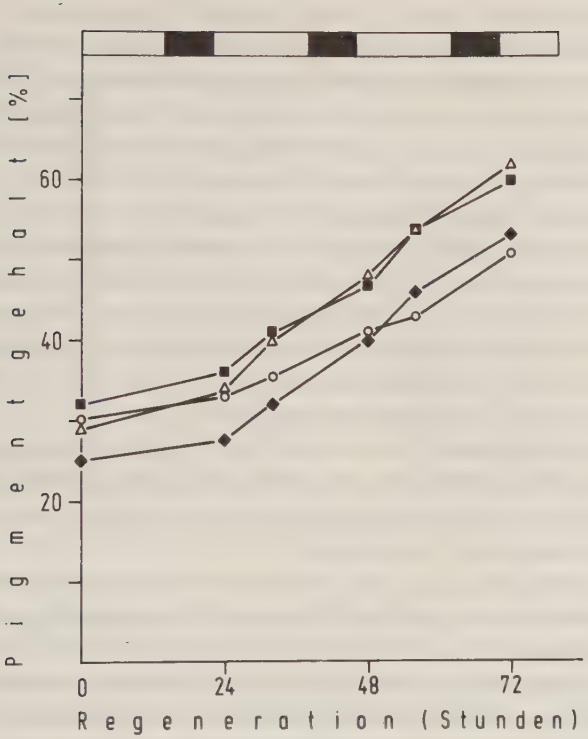


Fig.4 Neusynthese von Pigmenten nach N-Mangel während 72-stündiger Regeneration in Vollnährmedium im 16:8 Std.-Tag. Der Pigmentgehalt ist auf die Normalkultur bezogen. -◆- = Phycoerythrin; -Δ- = Phycocyanin; -■- = Allophycocyanin; -○- = Chlorophyll a

Aufnahmen zu ersehen ist (Abb.12) findet in dieser Phase der Regeneration unter starker Volumenzunahme der Plastide eine Vermehrung von Stromaproteinen und die Wiederherstellung der Thylakoidmembranen statt. Die nach 48-stündiger Regenerationszeit erreichte Biliproteidkonzentration von ca. 50% der Normalkultur steht im Einklang mit dem noch spärlichen Phycobilisomenbesatz der Thylakoide entsprechender

Regenerationsstadien in Abb.14. Nach 72-stündiger Regeneration steigt der Phycoerythringehalt der Kultur von 25% auf 53%, der von Phycocyanin von 29% auf 62% und der von Allophycocyanin von 32% auf 60%. Abgesehen von einer kleinen Bevorzugung von Phycocyanin erscheinen die Biliproteide prozentual gleichmäßig regeneriert zu werden. Mit der Pigmentbildung verbunden ist ein Umschlag der Färbung der Kultur von Gelbgrün nach Braun bereits nach 24 Stunden.
Absorptionsspektren ganzer Zellen dieser Regenerationsphase weisen hingegen Extinktionen auf, die unterhalb der von N-Mangelkulturen liegen. Da nach elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Stärkegehalt der Zellen nach 24-stündiger Regeneration bereits wesentlich reduziert ist, kann die verminderte Absorption auf eine geringere Streuung des eingestrahlten Lichtes zurückgeführt werden.
Gegenüber der Neusynthese von Biliproteiden ist die Regeneration des Chlorophylls in der Kultur etwas reduziert. Im gleichen Zeitraum von drei Tagen wird der Anteil des Hauptpigments der Photosynthese von 30% nach N-Mangel auf 51% gesteigert.
In Fig.4 nicht übernommen ist die prozentuale Veränderung des Carotinoidgehaltes, dessen Anteil von 37% auf 64% während dreitägiger Regeneration ansteigt.
Der in Fig.4 dargestellte Ablauf der Pigmentregeneration läßt an seinem nicht geradlinigen Anstieg erkennen, daß jeweils nach Einsetzen der Lichtperiode eine verstärkte Biliproteidakkumulation erfolgt.

Vergleicht man die Regeneration der Thylakoide und die Werte der Pigmentneusynthese mit der damit verbundenen Steigerung der Photosynthesekapazität in Fig.5, so werden folgende Unterschiede deutlich. Übereinstimmung herrscht noch beim 8-Stunden-Wert zwischen Pigmentbildungsraten und der Steigerung der Photosyntheseleistung. Eine während dieser Zeit nur in Spuren meßbare Pigmentneusynthese geht einher mit der Zunahme der Photosynthese von 24% auf 26% der Normalkultur. Auch die feinstrukturell sichtbare Veränderung der Thylakoidmembranen, die wahrscheinlich einer Stabilisierung durch Produkte der angelaufenen Proteinsynthese entspricht, vermag nicht die Steigerung der Photosyntheseleistung zu bewerkstelligen. Wenn auch Hoober (1970) zeigte, daß in Chlamydomonas innerhalb von 8 Stunden die meisten Membranproteine synthetisiert werden, ist zur Steigerung der Photosynthe-

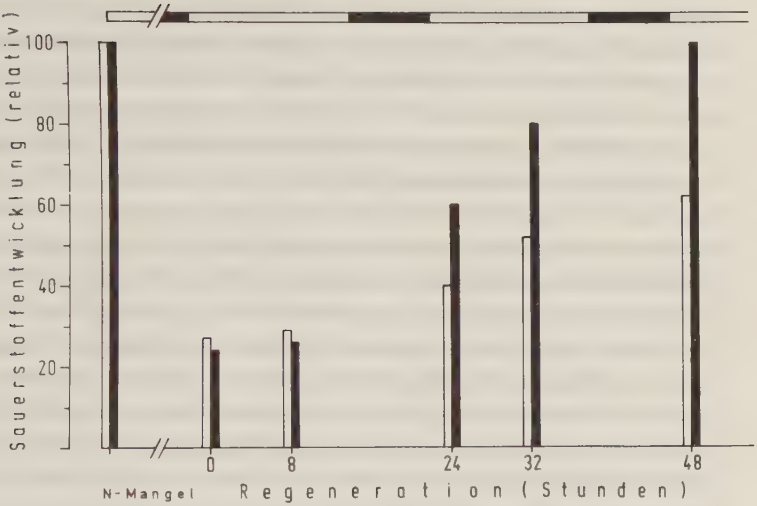


Fig.5 Steigerung der photosynthetischen Sauerstoffentwicklung der Gesamtphotosynthese (schwarze Säulen) und der Hill-Reaktion (helle Säulen) bezogen auf 100 rel. Einheiten in der Ausgangskultur. Der Absolutwert der Hill-Reaktion beträgt in der Normalkultur etwa 30% der Gesamtphotosynthese.

serate bei Rhodella zu diesem Zeitpunkt wohl noch eine weitere Komplettierung der Membranen durch Inkorporation von Struktur- und Funktionsproteinen unerläßlich, wie aus dem weiterhin vorliegenden veränderten Kontrastierungsverhalten hervorgeht (Abb.12).

Eine vollständige Regeneration der Thylakoide scheint nach 24 Stunden gewährleistet (Abb.13). Gleichzeitig wird in dem genannten Zeitraum ein gewisses Maß an Pigmenten wie Chlorophyll a und Biliproteiden neu synthetisiert. Wie in Fig.5 zu sehen, ist mit diesen Veränderungen eine Steigerung der Photosynthesekapazität auf 60% der Normalkultur verbunden. Diese enorme Leistungssteigerung ist mit der im Verhältnis dazu geringfügigen Pigmentsynthese alleine nicht zu erklären, vielmehr muß die Veränderung des Thylakoidsystems selbst als für

diese Steigerung bedeutsam angesehen werden.
Es kann angenommen werden, daß auch in kollabierten Thylakoiden ein gewisser Prozentsatz an Chlorophyll in Form von Chlorophyll-Proteinkomplexen existent ist. Machold, Simpson u. Høyer-Hansen (1977) untersuchten kürzlich mit Hilfe der Gefrierätztechnik die Existenzfähigkeit und Stabilität von Chlorophyll-Proteinkomplexen in Chloroplasten der Gerste. Sie konnten zeigen, daß auch nach Abbau der meisten Proteine der Thylakoidmembranen die Chlorophyll-Proteinkomplexe existent blieben. Das einzige Extraktionsverfahren, das beide Chlorophyll-Proteinkomplexe entfernte, desintegrierte die Membranen selbst auch, was zu Lipid-Artefaktstrukturen führte.
Nach einer wie mit dem 6-tägigen N-Mangel verbundenen Desorganisation des Thylakoidsystems, bei der aber die Integrität der einzelnen Membranen beibehalten wird, sollten daher die Chlorophyll-Proteinkomplexe stabil sein, während andere Komponenten wie z.B. Elemente der Elektronentransportkette oder einfach Strukturproteine ausgefallen sein können.
Diese Interpretation kann zusätzlich zum Pigmentverlust den sehr starken Abfall der Photosyntheseleistung nach N-Mangel erklären.
Gleichzeitig kann dieser Befund aber auch zur Deutung der Beobachtung herangezogen werden, daß eine gegenüber der Pigmentsynthese überproportionale Steigerung der Photosyntheseleistung nach Komplettierung der Thylakoidmembranen erfolgt. Denn daß in der Natur mit einem Überschuß an Pigmenten gearbeitet wird, ist hinreichend bekannt geworden.
Im gleichen Sinn kann auch der Befund gewertet werden, daß nach 48-stündiger Regeneration die Photosynthesekapazität die Höhe der Normalkultur erreicht hat (Fig.5), während zu diesem Zeitpunkt erst ein Pigmentgehalt von 40-50% vorliegt.

Im Gegensatz zur Gesamt-Photosyntheseleistung wird die Hill-Reaktion während der Regeneration in 48 Stunden nicht im gleichen Maße gesteigert. Vergleichbare Werte ergeben sich nach den ersten 8 Stunden, wo die Zunahme der Hill-Aktivität 2% ausmacht. Nach weiteren 16 Stunden wird ein Wert von 40% erreicht. Die 48-stündige Regeneration ist charakterisiert durch einen Wert um 62%, was etwas mehr als der Verdoppelung der Hill-Aktivität gegenüber der N-Mangelkultur entspricht.

Auch die Steigerung der Hill-Aktivität nach N-Mangel bedarf der Komplettierung der Thylakoidmembranen mit Struktur- und Funktionsproteinen. Da aber die Biliproteide als akzessorische Pigmente ihre absorbierte Lichtenergie überwiegend ins Photosystem II einfließen lassen (Lemasson, Tandeau de Marsac u. Cohen-Bazire, 1973; Porter, et al., 1978), sind zur Steigerung der Hill-Aktivität funktionsfähige Phycobilisomen notwendig, um den Energietransfer bewerkstelligen zu können.
Da auch hier die prozentuale Steigerung der Hill-Reaktion während 48-stündiger Regeneration größer ist als die Regeneration der Pigmente, gewinnt die Beobachtung an Bedeutung, daß die den N-Mangel überdauernden Phycobilisomen während der Regeneration in ihren Dimensionen verändert werden. Zum neu synthetisierten Biliproteidmaterial während der Regeneration könnten zu diesem Zeitpunkt zum Aufbau funktionsfähiger neuer Phycobilisomen mit geringerer Größe (siehe 3.4.2.) auch Komponenten "alter" Phycobilisomen beigesteuert werden. Der Gewinn würde dabei darin bestehen, daß eine größere Anzahl kleinerer Phycobilisomen, die aber funktionell gleichwertig sind, zur Verfügung stehen.
Den vereinzelt auf den entfalteten Thylakoiden des 24-stündigen Regenerationsstadiums zu beobachtenden "granulären Komponenten", die hin und wieder bis zu 25 nm in der senkrechten Entfernung vom Thylakoid messen können, muß ebenfalls die Fähigkeit zum Energietransfer auf das Reaktionszentrum der Photosynthese zugebilligt werden, da innerhalb dieses Zeitraums eine 13%-ige Steigerung der Hill-Aktivität meßbar ist.

Werden schon während der starken Belastung der Zelle durch Stickstoffmangel die Mitochondrien gegenüber anderen Zellstrukturen konserviert (siehe 3.3.), so wird nach Zugabe von Nitrat zum Nährmedium und damit verbundener intensiver Proteinsynthese, die der Anlieferung großer Mengen an ATP bedarf, eine zügige Regeneration auch der Mitochondrien erwartet.
Die Steigerung der Atmung während der Regenerationsphase ist in Fig.6 graphisch dargestellt. Wie die beiden Atmungswerte der Normal- und der N-Mangelkultur zeigen, wird nach Weißlichtbestrahlung ein um 14% höherer Wert erzielt. Unabhängig aber von der Art der Vorbe-

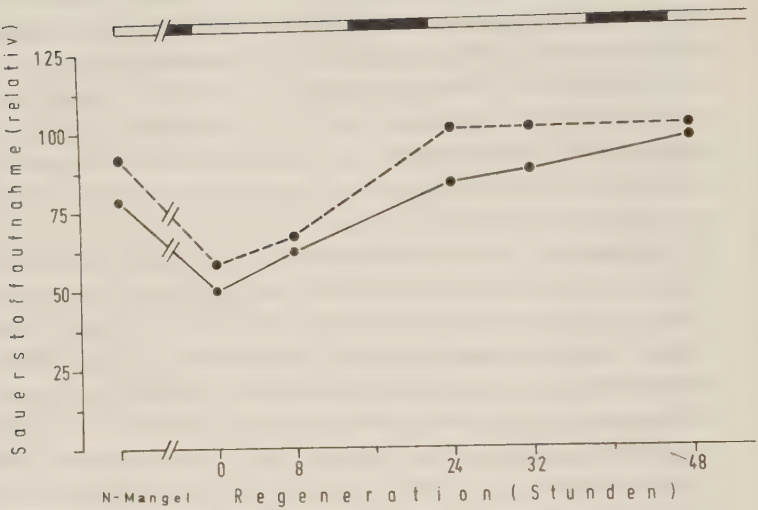


Fig.6 Regeneration der mitochondrialen Atmungskapazität nach N-Mangel. Sauerstoffaufnahme nach vorhergehender Rotlichtbestrahlung (———). Weißlichtvorbelichtung (- - - -). Der Sättigungsbereich nach vorhergehender Weißlichtbestrahlung entspricht 100 relativen Einheiten.

lichtung ist der 6-tägige N-Mangel durch einen Wert um 62% der Normalkultur zu charakterisieren. Schon nach 8-stündiger Regeneration ist die Atmung auf 79% gestiegen und nach weiteren 16 Stunden wird ein Wert über das Maß der Normalkultur hinaus erzielt.

Da die mit Weißlicht vorbelichteten Zellen nach 24 Stunden einen Sättigungswert erreichen, der in der Fig.6 mit 100 relativen Einheiten gleichgesetzt ist, werden weiterhin nur noch die Werte der mit Rotlicht bestrahlten Zellen angesprochen, da sie eine bessere Charakterisierung der Verhältnisse erlauben.

Nach 24-stündiger Regeneration der Mitochondrien wird eine Atmungsrate erzielt, die mit 5% über dem Wert der Normalkultur liegt. Neben der vollständigen Regeneration des Thylakoidsystems (Abb.13) sind die Zellen also in der Lage, im gleichen Zeitraum auch die Mitochondrien

so massiv mit Komponenten zu beliefern, daß ihre Leistungsfähigkeit innerhalb so kurzer Zeit die der Normalkultur sogar noch übertrifft. Der Auf- und Umbau der Zellstrukturen in der weiteren Folge der Regenerationsprozesse scheint soviel Energie zu benötigen, daß auch die Atmungskapazität weiter gesteigert wird. So wurde für das 48-Stundenstadium ein Respirationswert ermittelt, der mit 21% den Wert der Normalkultur übersteigt.
Die Bedeutung der Mitochondrien für die Zelle von Rhodella wird also nicht nur dadurch deutlich, daß diese bei Belastung durch eine Mangelsituation gegenüber anderen Strukturen konserviert werden, sondern auch durch den Befund, daß deren Regeneration und Neubildung nach Entfernung des Mangels sogar weiterhin begünstigt ist.

3.6. Bestandsaufnahme und Folgerungen

Die mit dem Ablauf normaler Cytokinese in Rhodella violacea erfolgende Aufteilung der Plastide löst so geringfügige Neubildungsprozesse aus, daß deren quantitative Erfassung schwierig ist. Durch die Anwendung eines 6-tägigen Stickstoffmangels hingegen wird eine Situation in der Zelle induziert, die es erlaubt, Differenzierungs- und Pigmentbildungsprozesse der Plastide feinstrukturell und pigmentanalytisch zu erfassen.
Diese Analyse nach N-Mangel geht von der Erwartung aus, allgemeine Gesetzmäßigkeiten dieses Geschehens unabhängig vom N-Mangel zu erfassen. Der N-Mangel sollte also das Differenzierungsgeschehen selbst nicht wesentlich modifizieren. Es konnte oben gezeigt werden, daß die Zellen trotz der drastischen Veränderungen nach Nitratmangel strukturell und funktionell vergleichsweise rasch regenerieren. Die somit erwiesene Reversibilität der eingetretenen Effekte und die Vitalität der Zellen lassen daher das N-Mangelsystem zum Studium von Differenzierungsvorgängen geeignet erscheinen.
Folgende weitere Bedingungen sind jedoch an den Einsatz der N-Mangelkulturen zu stellen:

1. Die Kultur muß in der Lage sein, rasch zu regenerieren, um den vorgesehenen Einsatz von Antibiotika in vivo möglichst befristet durchführen zu können.
2. Die Zellen sollten sich während der Regeneration nach N-Mangel innerhalb des gleichen Zeitraums aus Gründen der feinstrukturellen und pigmentanalytischen Vergleichbarkeit nicht teilen.
Die erste an die Kultur gestellte Forderung ist voll erfüllt; die zweite ist für die ersten 48 Stunden der Regeneration nach N-Mangel gesichert. Danach treten Zellteilungen in geringem Umfang mit $\leq 5\%$ auf.

Trotz der beträchtlichen Veränderungen in der Zelle bleibt bei einem auf 6 Tage befristeten N-Mangel gewährleistet, daß sämtliche Zellkomponenten wenigstens partiell erhalten sind; unter dieser Voraussetzung erscheint auch der Einsatz von Hemmstoffen mit unterschiedlichen Angriffsorten gerechtfertigt und im Sinne der erwarteten Primärwirkung interpretierbar.

3.7. Untersuchungen zur Wirkung von Inhibitoren der Proteinsynthese an cytoplasmatischen Ribosomen auf die Regeneration von Rhodella nach N-Mangel

Zum Studium der Produkte der cytoplasmatischen- wie der plastidären Proteinsynthese wurden schon früh Antibiotika eingesetzt. Eines der gebräuchlichsten und gleichsam bestuntersuchten Antibiotika ist Cycloheximid, das sich aktiv in eukaryotischen Organismen erwies, während Prokaryonten nicht angegriffen werden (Siegel u. Sisler, 1963; Ennis u. Lubin, 1964; Wettstein, Noll u. Penman, 1964; Bennett, Ward u. Brockman, 1965). Durch Untersuchungen an verschiedenen Species von Saccharomyces konnte geklärt werden, daß der Angriffsort die Ribosomen sind (Siegel u. Sisler, 1965; Cooper, Banthorpe u. Wilkie, 1967). Die Resistenz bzw. Sensitivität für Cycloheximid ist mit der 60S-ribosomalen Untereinheit des 80S-Ribosoms assoziiert (Rao u. Grollman, 1967). Die Aminosäureinkorporation durch Mitochondrien in vitro hingegen wird bis zu Konzentrationen von 10^{-3} M nicht beeinträchtigt (Beattie, Basford u. Koritz, 1967; Sebald et al., 1969).
Dies zeigt, daß zwar 80S-Ribosomen effektiv von Cycloheximid angegriffen werden, die Proteinsynthese an 70S-Ribosomen hingegen ungehindert abläuft. Die Primärwirkung soll dabei eine Inhibierung der peptidyl-tRNA-Translokation (Baliga, Cohen u. Munro, 1970; Obrig et al., 1971) sowie einen direkten Effekt auf das Peptidyl-Transferase-Zentrum (Pestka et al., 1972) beinhalten.

Tests im in vivo System zeigten, daß 1 ug/ml Cycloheximid ausreichen, um die Proteinsynthese an cytoplasmatischen Ribosomen von Chlamydomonas zu blockieren (Hoober, Siekevitz u. Palade, 1969; Eytan u. Ohad, 1970), während die Proteinsynthese der Chloroplasten immun gegen die Behandlung ist (Hoober u. Blobel, 1969; Armstrong et al., 1971).
Aus diesem Grunde wurde im Rhodellasystem in Vorversuchen eine Konzentration von 1 ug/ml und 2 ug/ml Cycloheximid getestet. Dabei

konnte beobachtet werden, daß die Konzentration von 2 ug/ml die Effekte auf die Regeneration bestimmter Komponenten nicht mehr zu steigern vermochte. Da für alle Antibiotika-Einsätze grundsätzlich eine möglichst geringe Konzentration erwünscht ist, um Nebeneffekte zu vermeiden, wurde im Verlauf der nachfolgend geschilderten Experimente stets eine Konzentration von 1 ug/ml Cycloheximid eingesetzt.

3.7.1. Elektronenmikroskopische Befunde zur Wirkung von Cycloheximid auf die Regeneration nach N-Mangel.

3.7.1.1. Allgemeine Charakterisierung der Zelle: Die in Abb.15 vorgestellte Übersicht einer Zelle repräsentiert den Zustand nach 48-stündiger Regeneration in Vollnährmedium in Anwesenheit von Cycloheximid. Obwohl die gegenüber der N-Mangelkultur eingetretenen Veränderungen deutlich hervortreten, wurde auch hier eine Reihe von Übersichtsbildern planimetrisch ausgewertet. Die den Werten aus N-Mangelkultur gegenübergestellten prozentualen Flächenanteile bilden dabei den Mittelwert aller erzielten Auswertungen.

	Zellkern	Plastide+ Pyrenoid	Stärke	Vakuole	Cytoplasma
6-tägige N-Mangelkultur	5%	15%	18%	43%	19%
Regeneration (CHI)	5%	20%	36%	21%	18%

Während 48-stündiger Regeneration in Vollnährmedium in Anwesenheit von Cycloheximid wird der N-Mangelzustand nur in Bezug auf zwei Komponenten wesentlich verändert. Während die Flächenanteile des Zellkerns und des Cytoplasmas konstant bleiben und auch die flächenmäßige Ausdehnung der Plastide in nur geringem Ausmaße zunimmt,

wird die Menge an gespeicherter Florideenstärke massiv verändert. Machte noch in der N-Mangelkultur der flächenmäßige Anteil der Reservestoffe 18% der Gesamtfläche aus, so sind nach Einwirkung von Cycloheximid auf die regenerierende Kultur nach 48 Stunden 36% der gesamten Fläche der Zelle mit Stärkekörnern angefüllt. Dies entspricht in etwa einer Verdoppelung des Zellgehaltes an Reservestoffen. Durch diese starke Veränderung des prozentualen Flächenverhältnisses muß zumindest eine andere Zellkomponente flächenmäßig reduziert werden. Wie aus der Gegenüberstellung der Flächenanteile hervorgeht, sind von dieser Reduktion die Zellsaftvakuolen betroffen, deren Anteil von 43% auf 21% der Gesamtfläche absinkt.
Nach Ausschalten der cytoplasmatischen Ribosomen während der Regeneration ist die Zelle nicht mehr in der Lage, den flächenmäßigen Anteil der Plastide bedeutend zu verändern. Denn während nach 48-stündiger Normalregeneration die Plastide wiederum fast die Hälfte der Zelle ausfüllt, kann nach Fehlen der im Cytoplasma zu bildenden Proteinen die Plastidenfläche mit 5% nur geringfügig gegenüber der N-Mangelkultur verändert werden.
Dies ist ein erster Gesichtspunkt für die Bedeutung der Proteinsynthese an cytoplasmatischen Ribosomen im Hinblick auf die Differenzierung des Chloroplasten auch in Rhodella violacea.

3.7.1.2. Feinbau der Plastide: Die Bedeutung der cytoplasmatischen Ribosomen gerade für die Regeneration des Thylakoidsystems wird nach stärkerer Vergrößerung eines Teils der Plastide im elektronenmikroskopischen Bild der Abb.16 deutlich.
Vergleicht man die hier vorliegenden Verhältnisse in Bezug auf Thylakoiddarstellung und -ordnung mit bisher beschriebenen Stadien der Plastidenentwicklung, so herrscht noch in einigen Punkten deutliche Übereinstimmung mit den Verhältnissen in der N-Mangelkultur vor. Übereinstimmung ergibt sich hinsichtlich des gewundenen Thylakoidverlaufs und der Belegung auch der zentralen Bereiche der Plastidenmatrix. Dies ist verständlich wegen der nur geringen Volumenzunahme derselben. Ebenso vergleichbar sind die Kontrastunterschiede innerhalb der Thylakoidmembranen, die in tordierten Thylakoidbereichen weiterhin deutlich stärker elektronenstreuend als in den geradflächigen randlichen Bereichen erscheinen. Dies spricht für verstärkte Osmiophilie,

d.h. einen relativ höheren Lipidgehalt.
Die gewellte Oberflächenausbildung der Thylakoide in N-Mangelstadien ist hingegen verändert, so daß über weite Strecken distinkte Profilansichten der Membranen gewonnen werden. Dies wird zusätzlich dadurch verstärkt, daß die Kontaktzonen der Membranen untereinander aufgehoben sind. Der Mittelwert der Bestimmungen der senkrechten Entfernung zwischen den Thylakoidmembranen beträgt 5,2 nm.

Alle Punkte zusammen gesehen ergeben das gleiche Bild wie nach 8-stündiger Regeneration in Vollnährmedium (Abb.12).

Während in der Kontrolle innerhalb von 48 Stunden nach N-Mangel die Plastide in Bezug auf das Thylakoidsystem qualitativ und quantitativ zu regenerieren vermochte (Abb.14), bleibt nach Blockierung der cytoplasmatischen Proteinsynthese durch Cycloheximid während des gleichen Zeitraums die Regeneration der Thylakoide nahezu am Ausgangspunkt der Regeneration stehen, obwohl davon ausgegangen werden kann, daß die Proteinbiosynthese an plastidären Ribosomen weiterhin ungestört abläuft.
Daß zu diesem Zeitpunkt nach 48-stündiger Einwirkung von Cycloheximid plastideneigene Ribosomen in der Plastidenmatrix vorhanden sind, läßt sich aufgrund ihrer Größe und Form anhand zahlreicher Aufnahmen wie auch in Abb.16 klar nachweisen.

Die Regenerationsstudien an Rhodella violacea spiegeln mit der Abb. 16 die überragende Bedeutung der Cytoplasmaribosomen für die Formation eines normal organisierten Thylakoidsystems wider. Ob dabei die Syntheseprodukte der plastidären Proteinsynthese für die feinstrukturell sichtbaren Veränderungen gegenüber dem N-Mangelstadium verantwortlich sind, bedarf einer weiteren Untersuchung (siehe 3.7.3.). Hingegen darf angenommen werden, daß die zwar geringe, aber doch registrierbare prozentuale Flächenzunahme der Plastide auch auf Synthese löslicher Proteine zurückzuführen ist. Da aufgrund der beschriebenen Ergebnisse die Blockierung der cytoplasmatischen Ribosomen als vollständig angesehen werden kann, wird die Biosynthese dieser Proteine der Leistung chloroplasteneigener Ribosomen zugeschrieben.

Die in sehr geringer Entfernung voneinander verlaufenden Thylakoidmembranen lassen eine Belegung mit Phycobilisomen natürlich nicht zu (Abb. 16). Deren Fehlen kann aber nicht als Beleg dafür gewertet werden, daß

Biliproteide nicht doch synthetisiert werden. Da es sich um pufferlösliche Makromoleküle handelt, können diese nach Kopplung der chromophoren Gruppen an die Proteinkomponenten in Ermangelung eines "Aggregationszentrums" auf den Membranen niedermolekular in der Plastidenmatrix vorliegen.
Eine spektralphotometrische Untersuchung sollte diese Frage klären, da auch die Einzelpigmente ihr Absorptionsverhalten in Lösung kaum verändern.

3.7.2. Pigmentanalytische und funktionelle Daten zur Wirkung von Cycloheximid während der Regeneration.

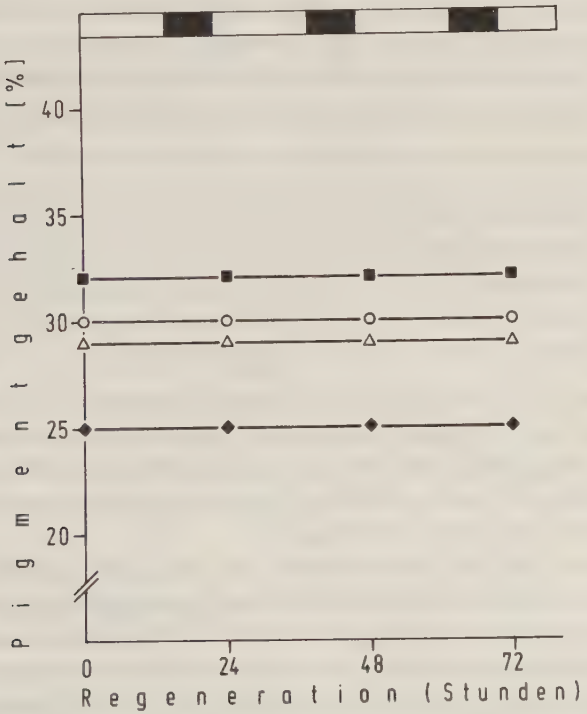


Fig.7 Pigmentregeneration bei Einwirkung von 1 ug/ml Cycloheximid. Symbole wie in Fig.4.

Die Veränderung des Chlorophyll- und Biliproteidgehaltes der Kultur während 72 Stunden Regeneration unter Einwirkung von Cycloheximid ist in Fig.7 dargestellt.
Der Kurvenverlauf aller Einzelpigmente entspricht einer Geraden, was anzeigt, daß sowohl Chlorophyll a wie auch alle drei Biliproteidkomponenten nach Ausschalten der Proteinsynthese an cytoplasmatischen Ribosomen nicht einmal mehr in Spuren gebildet werden. Ihre Synthese ist vielmehr von Beginn der Einwirkung von Cycloheximid an vollständig blockiert. Das gleiche Ergebnis gilt auch für die Synthese der Carotinoide. Diese Befunde belegen, daß die Produkte der Proteinsynthese an cytoplasmatischen Ribosomen nicht nur für den Aufbau des Thylakoidsystems von großer Bedeutung sind, sondern auch im Hinblick auf die Pigmentsynthese eine absolute Abhängigkeit besteht. Dies gilt nicht nur für Chlorophyll a, sondern auch für alle Biliproteidkomponenten.

Angesichts der durch Cycloheximid induzierten Blockierung der Cytoplasmaribosomen und deren Auswirkung auf die Thylakoid- und Pigmentregeneration erscheint es nicht verwunderlich, daß parallel zu diesen Befunden sowohl die Regeneration der Photosynthesekapazität als auch die der Hill-Reaktion stark betroffen sind. So wird nach 48-stündiger Cycloheximideinwirkung nur eine minimale Steigerung der O_2-Entwicklung beobachtet (Fig.11 und Fig. 12). Diese erreicht nach 8 Stunden ihren höchsten Wert und wird anschließend nicht mehr verändert.

Ebenso wie für die Chloroplasten werden wesentliche Proteine der Mitochondrien vom Zellkern codiert und vom Cytoplasma geliefert. Insofern wird verständlich, daß auch die Mitochondrien in Rhodella nach Ausschalten der cytoplasmatischen Proteinsynthese funktionell nicht zu regenerieren vermögen (siehe Fig.13).
Während aber für manche Proteine eine hohe turn-over Rate festgestellt wurde, bleibt die Atmungskapazität der Mitochondrien auch noch nach 72 Stunden unverändert, was auf einen konstanten Enzymgehalt hindeutet. Feinstrukturell hingegen wird das Bild der Mitochondrien der N-Mangelkultur (Abb. 16) während 48-stündiger Regeneration insofern verändert, als die tubulären Einstülpungen der inneren Mitochondrienmembran zu blasenförmiger Gestalt auswachsen (Abb.17). Der hohe Kontrast der Mitochondrien-Matrix bleibt dabei erhalten.

Beim Einsatz von Inhibitoren ist die Spezifität der Antibiotika-Wirkung von entscheidender Bedeutung für die eindeutige Interpretation der ermittelten Ergebnisse. Für Cycloheximid ist die Wirkung auf das proteinsynthetisierende ribosomale System des Cytoplasmas eindeutig belegt. Es gibt aber auch Befunde, daß Cycloheximid in Bezug auf andere Systeme ebenfalls eine Wirkung erzielen kann.
So beobachteten Ellis u. Mac Donald (1970) eine rasche Inhibierung der Chlorid-Aufnahme durch 1 ug/ml Cycloheximid. Weitere Effekte wurden beschrieben im Hinblick auf RNA-Polymerase (Timberlake u. Griffin, 1974), RNA-Synthese (Ro-Choi, 1976) und DNA-Synthese (Venkatesan, 1977). Insofern erschien es sinnvoll, die mit Cycloheximid erzielten Ergebnisse durch Einsatz eines weiteren Antibiotikums zu überprüfen.

3.7.3. Elektronenmikroskopische, pigmentanalytische und funktionelle Befunde zur Wirkung von D-MDMP auf die Regeneration nach N-Mangel.

Als weiterer Inhibitor der eukaryotischen Proteinsynthese wurde das D-Isomer von MDMP 2-(4-methyl-2,6-dinitroanilino)-N-methyl-propionamid eingesetzt. Die Strukturformel dieses Wirkstoffes wird in Fig.8 vorgestellt.

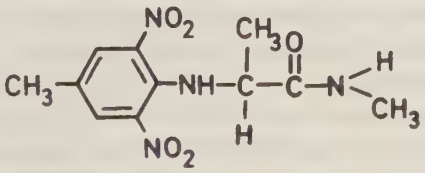


Fig.8 Strukturformel von MDMP.

Weeks u.Baxter haben 1972 die Wirkung dieser Verbindung zuerst untersucht und beschrieben. Sie fanden, daß MDMP ein potender Inhibitor der Aminosäureinkorporation im in vitro System von Weizen-Embryonen ist. Bei Konzentrationen oberhalb 5×10^{-5} M wird die TMV - RNA gesteuerte Peptidsynthese um mehr als 95% inhibiert. Im Gegensatz zu diesem

Befund am Eukaryonten-System wurde die Inkorporation von ^{14}C-Leucin in Zellen von verschiedenen Bakterien bis zu Konzentrationen von 10^{-4} M nicht beeinträchtigt (Baxter et al.,1973).
Bei der Analyse des Angriffsortes von MDMP (Weeks u. Baxter, 1972) fanden die Autoren, daß die Proteinsynthese an bestehenden Polysomenverbänden nicht inhibiert wird. Dies deutete darauf hin, daß der Initiationsprozess blockiert wird, während die Elongation nicht betroffen ist. MDMP scheint den Initiationsprozeß dadurch zu blockieren, daß eine Interaktion der ribosomalen 60S-Untereinheit mit dem 40S-Initiationskomplex verhindert wird.

Ellis zeigte 1975 (a), daß 5-20 uM MDMP die Proteinsynthese isolierter, intakter Chloroplasten nicht behindert.

Um beim Einsatz von MDMP in Rhodella die Möglichkeit von Nebeneffekten möglichst gering zu halten, andererseits aber deutliche Wirkung zu erzielen, wurden Konzentrationen von 10^{-5} M bis $4x10^{-5}$ M getestet. Dabei erwies sich bereits die Konzentration von 10^{-5} M (= 2,82 ug/ml) als ausreichend wirkungsvoll.

Bei dieser Konzentration bleiben die pigmentanalytischen Daten auf dem Niveau, wie es Fig.7 für die mit Cycloheximid behandelten Zellen während 72-stündiger Regeneration zeigt.
Auch die allgemeinen Charakteristika der Übersicht über die prozentualen Flächenanteile einer Zelle nach 48-stündiger Regeneration in Anwesenheit des Hemmstoffs stimmen mit den auf Seite 38 festgehaltenen Daten überein.
Die Details der Feinstruktur eines Teils der gelappten Plastide nach 48-stündiger Einwirkung von MDMP auf die Regenerationskultur sind in der Abb.18 ersichtlich. Die hier vorliegenden kollabierten Chloroplastenmembranen stimmen hinsichtlich der Thylakoiddarstellung und -ordnung mit dem Bild aus 48-stündiger Regeneration mit Cycloheximid in Abb.16 überein. Das gleiche gilt für die Thylakoidabstände. Ein Unterschied gegenüber der Abb.16 besteht hingegen darin, daß nach MDMP-Einwirkung hin und wieder noch Kontaktzonen zwischen gegenüberliegenden Thylakoidmembranen ausgebildet werden. Die in 3.7.1.2. aufgeworfene Frage, ob Produkte der plastidären Proteinsynthese für die feinstrukturell sichtbaren Veränderungen innerhalb der Membranen verantwortlich sind, kann somit eindeutig verneint werden.

Vielmehr scheinen die Ergebnisse dafür zu sprechen, daß MDMP schneller als Cycloheximid in die Zellen einzudringen vermag und dadurch gleich zu Beginn der Nitrataufnahme die an cytoplasmatischen Ribosomen wiederum anlaufende Proteinneusynthese zu blockieren in der Lage ist. Auch in dem hier vorgestellten Plastidenteil ist die Matrix angefüllt mit korpuskulären ribosomalen Komponenten.
MDMP erweist sich dadurch auch in Rhodella als ein sehr geeigneter Hemmer der cytoplasmatischen Proteinsynthese.

Die mit der Einwirkung von MDMP verbundene schnelle Blockierung der cytoplasmatischen Ribosomen geht einher mit einer nur so geringen Photosyntheserate, daß deren Werte noch unter denen mit Cycloheximid ermittelten liegen (Fig. 11).
Sowohl die Sauerstoffentwicklung im Licht als auch die Atmung bei Dunkelheit bleibt während 72 Stunden konstant. Sämtliche Komponenten der Plastide und der Mitochondrien erweisen sich dadurch als sehr resistent gegenüber jeglichen Abbautendenzen.

Da die Ergebnisse der Untersuchungen mit Cycloheximid und MDMP in allen entscheidenden Punkten übereinstimmen, kann insgesamt für die Ribosomen des Cytoplasmas eine überragende Bedeutung im Hinblick auf Thylakoidformation, Pigmentsynthesen und Differenzierung des Chloroplasten in Rhodella violacea nachgewiesen werden.

3.8. Untersuchungen zur Wirkung von Inhibitoren der Proteinsynthese plastideneigener Ribosomen auf die Regeneration von Rhodella nach N-Mangel.

Die spezifische Inhibierung bakterieller Proteinsynthese durch Antibiotika im allgemeinen und speziell durch Chloramphenicol wurde durch Arbeiten an intakten Bakterien schon früh bekannt und gestützt durch Untersuchungen an verschiedenen zellfreien Systemen (Vazquez, 1966). Chloramphenicol bindet spezifisch an die 50S-Untereinheit des 70S-Ribosoms (Vazquez, 1964). Es verhindert die funktionelle Verknüpfung des Aminoacylendes der Aminoacyl-tRNA im A-Ort des aktiven Zentrums, wodurch die Peptidbindung nicht vorgenommen werden kann (Pestka, 1969 a,b; Celma, Monro u. Vazquez, 1971). Neuere Untersuchungen ließen die Vermutung der Beteiligung von Protein L16 an der Chloramphenicol-Bindung auftauchen (Nierhaus u. Nierhaus, 1973; Pongs, Bald u. Erdmann, 1973). Weiterhin wird ein direkter Inhibitoreffekt auf das Peptidyl-Transferase-Zentrum des Ribosoms diskutiert (Monro u. Vazquez, 1967). Ellis zeigte 1969, daß die Chloroplastenribosomen von Tabakblättern dem gleichen spezifischen Inhibitoreffekt von Chloramphenicol unterliegen wie die Bakterienribosomen, während unter den gleichen Bedingungen die cytoplasmatischen Ribosomen nicht angegriffen werden. Dieser Effekt beruht auf der nahen phylogenetischen Verwandtschaft von prokaryotischen und organelleneigenen Ribosomen der Eukaryonten. So wurde gezeigt, daß die Ribosomen von Prokaryonten und Chloroplasten gleich sind in Bezug auf die Sedimentations-Koeffizienten sowohl der Ribosomen (70S) wie auch der ribosomalen RNA (Rawson u. Stutz, 1969). Der Aufbau eines hybriden, funktionsfähigen 70S-Ribosoms wurde beschrieben (Lee u. Evans, 1971). Neuere Untersuchungen lieferten den direkten Beweis für die prokaryotische Natur der 16S-ribosomalen RNA in Euglena gracilis (Zablen et al., 1975) und Porphyridium cruentum (Bonen u. Doolittle, 1975).

Für Untersuchungen an Grünalgen wurden Konzentrationen zwischen 20 und 200 ug/ml Chloramphenicol eingesetzt (Hoober, Siekevitz u. Palade, 1969; Hoober u. Stegeman, 1973), wobei sich überwiegend 50 und 100 ug/ml als zweckmäßig erwiesen.

Wegen der bei Cycloheximid vergleichbaren Konzentrationsabhängigkeit der Auswirkungen im Grünalgen- und Rotalgensystem kamen die obigen Konzentrationen an Chloramphenicol auch in Rhodella violacea zuerst zum Einsatz. Während aber die höheren Chloramphenicol-Konzentrationen bei Grünalgen keine gravierenden Schädigungen hervorrufen, kommt es beim Einsatz von 100-200 ug/ml in Rhodella zu einer schnellen Absenkung des gesamten Absorptionsspektrums, was auf massive Veränderungen in der Zellkomposition hindeutet. Diese unspezifischen Effekte lassen sich bei Konzentrationen von 25-50 ug/ml reduzieren. Als geeignete Konzentration zur Untersuchung der Regeneration nach N-Mangel erwies sich schließlich 10 ug/ml (siehe 3.8.2.), die allen nachfolgenden Experimenten zugrunde liegt.

3.8.1. Elektronenmikroskopische Befunde zur Wirkung von Chloramphenicol auf die Regeneration nach N-Mangel.

3.8.1.1. Allgemeine Charakterisierung der Zelle: Die Abb.19 gibt einen Überblick über die Verhältnisse innerhalb der Zelle nach 48-stündiger Regeneration nach N-Mangel in Anwesenheit von Chloramphenicol. Deutliche Unterschiede zu den Verhältnissen im N-Mangelstadium werden sichtbar.Die Florideenstärke der Zellen ist reduziert und der Zellbinnenraum besitzt kaum Zellsaftvakuolen. Zellkern und Pyrenoid zeigen die normale Lage, während die Fläche des Pyrenoids in vielen Querschnitten reduziert erscheint.
Eine starke Flächenzunahme hingegen erfahren die einzelnen Plastidenteile, die dem Stadium 48-stündiger Normalregeneration gleichwertig erscheint. Nach Cycloheximid-Einwirkung während des gleichen Zeitraums war zwar ebenfalls eine gewisse Flächenzunahme der Plastide registrierbar (3.7.1.1.), diese bleibt aber deutlich hinter der nach Applikation von Chloramphenicol zurück. Die Regeneration des Flächenanteils der Plastide, die wohl überwiegend der Synthese an löslichen Proteinen zugeschrieben werden kann, ist daher vermutlich stärker abhängig von der cytoplasmatischen Proteinsynthese.

3.8.1.2. Feinbau der Plastide: Einige bedeutsame Unterschiede gegenüber der N-Mangelkultur ergeben sich auch im Feinbau der Plastide (Abb. 20).

Waren dort die Thylakoidmembranen nach Verlust der Phycobilisomen kollabiert und verliefen in geringen Abständen zueinander, so zeigen nach Regeneration in chloramphenicolhaltigem Vollnährmedium die Membranen wieder einen äquidistanten Verlauf mit senkrechten Entfernungen von 23-40 nm.

Da der Zeitraum von 48 Stunden selbst in der antibiotikafreien Regenerationskultur nicht ausreichte, um nach völliger Komplettierung des Thylakoidsystem die Membranen wie gewohnt auf den peripheren Bereich der Plastide zu verlagern, belegen die Thylakoidmembranen nach Chloramphenicol-Behandlung ebenfalls weiterhin die zentralen Bereiche der Plastide. Ein Kontrastvergleich zwischen peripheren-, mit den Chlorplastenhüllmembranen parallel verlaufenden Thylakoiden und solchen aus zentralen Lagen, die einen wellenförmigen Verlauf aufweisen, zeigt, daß kein Unterschied mehr vorhanden ist. Die bei Anwesenheit von Chloramphenicol veränderten Thylakoidmembranen sind daher feinstrukturell gesehen als vollständig regeneriert anzusprechen.

Konnten die Produkte der Proteinsynthese plastideneigener Ribosomen bei der Blockierung der cytoplasmatischen Ribosomen besonders durch D-MDMP die Feinstruktur der kollabierten Thylakoide nicht verändern (3.7.3.), so bestätigt dies den obigen Befund, daß sie für die feinstrukturell sichtbare Komplettierung des Thylakoidsystems offensichtlich ohne Bedeutung sind (Abb.20).

Beim Vergleich des hier vorliegenden Entwicklungszustands der Plastide mit anderen bisher beschriebenen Stadien fällt die große Ähnlichkeit mit dem Bild 24-stündiger Normal-Regeneration auf (Abb.13). Beiden gemeinsam ist die vollständige Thylakoidregeneration sowie das Fehlen von Phycobilisomen in ihrer typischen Gestalt und Anordnung. Während aber 24 Stunden später auf den Thylakoidmembranen der Kontrolle Phycobilisomen eindeutig nachweisbar sind, können sogar nach 72-stündiger Regeneration mit Chloramphenicol in elektronenmikroskopischen Aufnahmen keine neu synthetisierten Phycobilisomen nachgewiesen werden(nicht gezeigt). Die nach Regeneration mit Chloramphenicol in ausreichender Entfernung voneinander verlaufenden äquidistanten Thylakoide lassen eine erneute Belegung mit Phycobilisomen im Gegensatz zu den feinstrukturellen Verhältnissen nach Behandlung mit Cycloheximid und MDMP unmittelbar zu. Deren Fehlen zeigt aber, daß neben cyto-

plasmatischen Proteinsyntheseprodukten auch solche der Plastide notwendig sind, um zumindest eine Akkumulation von Biliproteidmaterial in Form von Phycobilisomen auf den Thylakoidmembranen zu ermöglichen.
Deutlich ist die gegenüber dem 8-stündigen Regenerationszustand der Normalkultur in Abb. 20 sichtbare Kontraststeigerung in der Plastidenmatrix. Diese ist vermutlich auch mit der Synthese neuer plastidärer Ribosomen zu erklären. Da für Chlamydomonas eindeutig nachgewiesen werden konnte, daß Gene für Proteinkomponenten der Chloroplasten-Ribosomen sowohl im Kern wie auch im Plastom lokalisiert sind (siehe Bogorad, 1975), wird eine Beteiligung der Plastidenribosomen an deren Neusynthese wahrscheinlich. Ob die bei Anwesenheit von Chloramphenicol gebildeten Chloroplastenribosomen voll funktionsfähig sind, bleibt daher eine offene Frage.
Die Verringerung der Elektronentransparenz der Plastidenmatrix führt dazu, daß das fibrilläre Material der Chloroplasten-DNA verstärkt maskiert wird. Stets aber bleiben die DNA-Zentren eindeutig nachweisbar (Z).

3.8.2. Pigmentanalytische und funktionelle Daten zur Wirkung von Chloramphenicol während der Regeneration.

Die spektralphotometrische Kontrolle der Pigmentbildung bei Einwirkung von Chloramphenicol wurde bei den Tests für die geeignete Konzentration in geringen Zeitabständen durchgeführt, um Veränderungen unphysiologischer Art registrieren zu können. Dabei stellte sich heraus, daß Konzentrationen um 10 ug/ml Chloramphenicol ausreichten, um deutliche Effekte auf die Pigmentsynthese registrieren zu können, gleichzeitig die Zelle aber nicht geschädigt wird (Abb.19). Auch Regenerationsstudien nach Entfernung des Inhibitors belegen, daß die Zellen während 72-stündiger Antibiotika-Einwirkung in der genannten Konzentration nicht irreversibel geschädigt werden (siehe 3.9.).

In Fig.9 sind die Raten der Biliproteid- und Chlorophyllsynthese nach 72-stündiger Einwirkung verschiedener Konzentrationen an Chloramphenicol in Prozent der Normal-Regeneration aufgetragen.
Wie diese Dosiseffektkurven der Biliproteid- und Chlorophyllregeneration

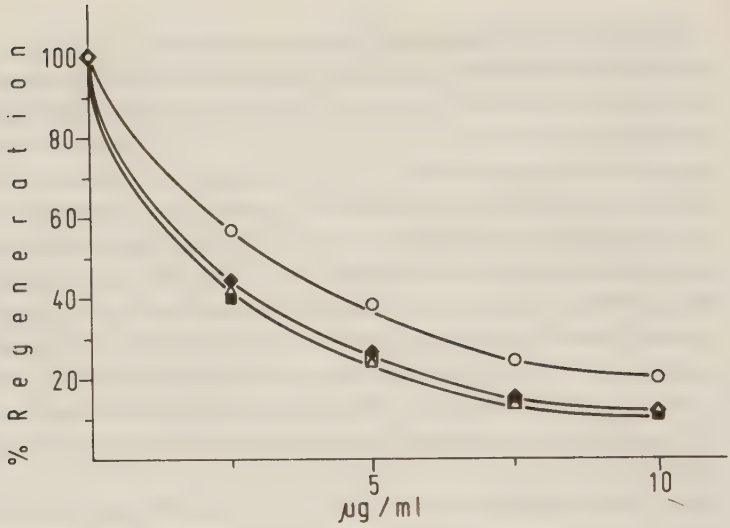


Fig.9 Dosiseffektkurven der Wirkung von Chloramphenicol auf die Pigmentakkumulation nach 72-stündiger Regeneration nach N-Mangel. Als Kontrolle dienen die Werte der Normalregeneration in Fig.4. Symbole wie in Fig.4.

ausweisen, handelt es sich um Sättigungskurven, die mit zunehmender Antibiotikakonzentration einem Grenzwert zustreben. Die Kurven sämtlicher Biliproteidkomponenten laufen einander sowie der von Chlorophyll exakt parallel, wobei die prozentuale Regeneration der verschiedenen Biliproteide unabhängig von der verwendeten Antibiotika-Konzentration stets nahezu gleich ist. Aus diesem Grunde werden die drei Biliproteidkomponenten auch nur durch zwei Kurven charakterisiert, die den oberen und unteren Wert umfassen.

Schon 2,5 ug/ml Chloramphenicol reichen aus, um die Biliproteidregeneration um nahezu 60% zu inhibieren, während die synthetisierte Chlorophyllmenge ca. 55% der Normalregeneration erreicht. 5 ug/ml Chloramphenicol führen zu einer im Durchschnitt 75%-igen Inhibierung der Biliproteidregeneration, bei 7,5 ug/ml bzw. 10 ug/ml wird der Effekt auf ca. 85- bzw. 90% gesteigert. Parallel dazu wird mit 10 ug/ml Chloram-

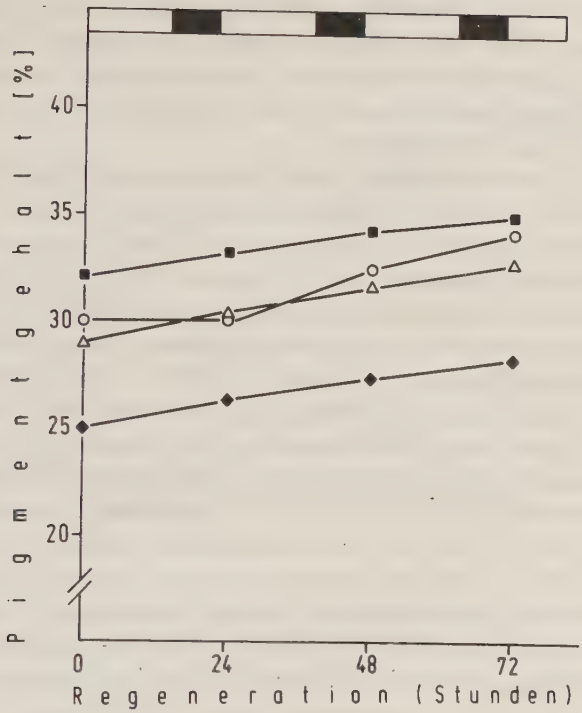


Fig. 10 Verlauf der Pigmentregeneration bei Einwirkung von 10 ug/ml Chloramphenicol auf die regenerierende Kultur. Die Werte zu Beginn der Antibiotika-Applikation beziehen sich auf den Pigmentgehalt der Normalkultur. Symbole wie in Fig.4.

phenicol eine Reduktion der Chlorophyllregeneration um 80% erreicht.

Der Verlauf der Regeneration der Biliproteidkomponenten und des Chlorophylls bei Anwesenheit von 10 ug/ml Chloramphenicol wird in Fig.10 gezeigt. Die Prozentwerte der Pigment-Konzentrationen beziehen sich dabei wie in Fig.4 auf den Pigmentgehalt der Normalkultur. Der Kurvenverlauf der Chlorophyll- und Biliproteidregeneration zeigt einen klaren Unterschied. Während in den ersten 24 Stunden nur Spuren von Chloro-

phyll gebildet werden, steigt der Gehalt in den folgenden zwei Tagen weiter an, wenn auch nur um 1/5 der Kontrolle. Im Gegensatz dazu ist für alle drei Biliproteidkomponenten auch in den ersten 24 Stunden ein klarer Anstieg festzustellen, der dann aber prozentual im weiteren Verlaufe der Regeneration abklingt.
Ein solcher Kurvenverlauf deutet auf die "Ausverdünnung" eines Faktors oder Proteins im Verlaufe der Regeneration hin (siehe 3.10.).
Wie aus den Figuren 9 und 10 ersichtlich wird, ist für eine Synthese von neuem Biliproteidmaterial nach N-Mangel nicht nur die Proteinsynthese an cytoplasmatischen Ribosomen unerläßlich, vielmehr führt auch die Anwesenheit eines Inhibitors der plastidären Proteinsynthese dazu, daß nach 72-stündiger Regeneration die Biliproteidakkumulation zu etwa 90% unterdrückt wird. Dieser starke Hemmeffekt wird dabei durch eine so geringe Chloramphenicol-Konzentration hervorgerufen, daß die Wirkung kaum ausschließlich Nebeneffekten des Wirkstoffs zugeschrieben werden kann. Vielmehr weisen auch die parallel durchgeführten Feinstrukturuntersuchungen, die u.a. eine nach Chloramphenicol-Einwirkung vollständige Regeneration der Plastide und des Thylakoidsystems belegen (Abb. 19 u. 20), darauf hin, daß intrazellulär keinerlei Schädigungen vorliegen. Die mit 10 ug/ml Chloramphenicol verbundene Hemmung der Biliproteidakkumulation kann daher mit einiger Sicherheit der spezifischen Blockierung der plastidären Proteinsynthese zugeschrieben werden.

Grundsätzlich muß bei der Synthese von Chromoproteiden zwischen der Bildung der chromophoren Gruppe und dem Apoprotein unterschieden werden. Wie aus Absorptionsspektren ganzer Zellen während der Regeneration mit Chloramphenicol entnommen werden konnte, ist neben der geringen Zunahme des Biliproteidgehaltes im Vergleich zu der Kontrolle keinerlei Synthese von freien Chromophoren zu erkennen, die sich durch Extinktionssteigerung im Bereich neben den Maxima der Proteide bemerkbar machen sollte (Köst, Rüdiger u. Chapman, 1975).

Durch Ausschalten der plastidären Proteinsynthese wird also neben der Inhibierung der Akkumulation von Biliproteid auch die Biosynthese von Phycobilinen unterdrückt.

Wie in 3.5. beschrieben wurde, führt die Komplettierung des Thylakoidsystems nach 24-stündiger Regeneration in Vollnährmedium bei

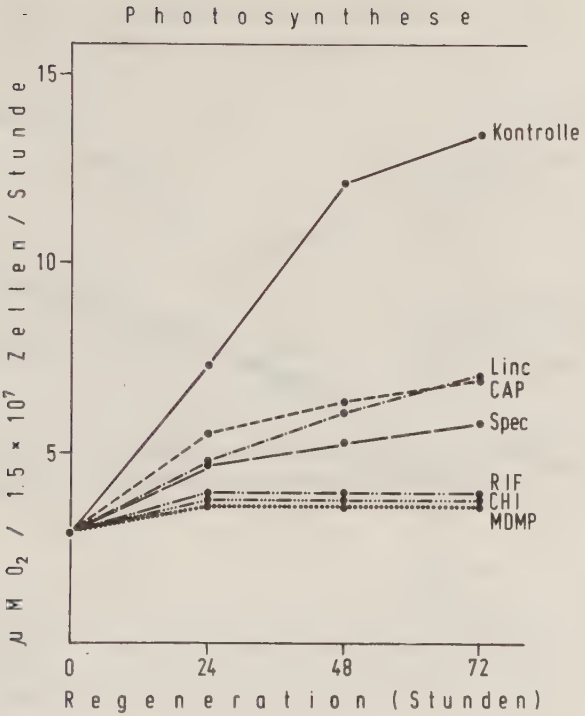


Fig.11 Steigerung der Photosynthesekapazität der Zellen nach N-Mangel bei Anzucht mit verschiedenen Antibiotika. Die Sauerstoffentwicklung ist in absoluten Einheiten angegeben. Kontrolle = Normalregeneration; Linc = Lincomycin; CAP = Chloramphenicol; Spec = Spectinomycin; RIF = Rifampicin ; CHI = Cycloheximid; MDMP siehe in 3.7.3.;

gleichzeitig noch geringer Zunahme des Pigmentgehaltes der Kultur zu einer überproportionalen Steigerung der Photosynthesekapazität. Aufgrund feinstruktureller Untersuchungen erfolgt nach Chloramphenicolbehandlung innerhalb von 48 Stunden die Thylakoidregeneration. Daher war ein Vergleich der Leistungsfähigkeit des Photosyntheseapparates dieser Kultur

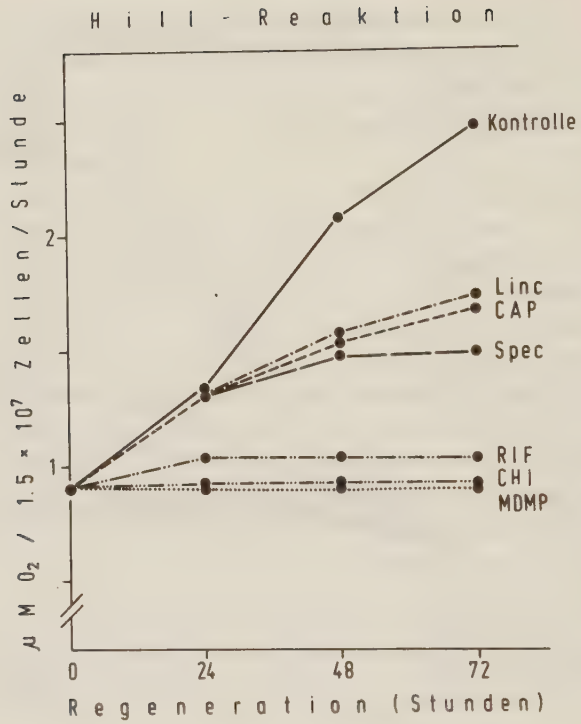


Fig.12 Steigerung der Hill-Aktivität nach N-Mangel bei Anzucht mit verschiedenen Antibiotika. Abkürzungen wie in Fig.11.

mit der der Kontrolle von Interesse.

In Fig.11 ist die Sauerstoffentwicklung der Kulturen der Kontrolle und sämtlicher verwendeter Antibiotika als Maß für die Leistungsfähigkeit des Photosyntheseapparates in Abhängigkeit von der jeweiligen Regenerationszeit aufgetragen. Ein Vergleich der Photosyntheserate der Kontrolle nach 24-stündiger Regeneration mit der der Chloramphenicolkultur nach 48-stündiger Regeneration zeigt, daß die Leistungssteigerung der letzteren nur geringfügig hinter der Kontrolle zurückbleibt. Da der Pigmentgehalt dieser Kulturen als nahezu gleichwertig angesehen werden kann, bestätigt dieses Ergebnis die in 3.5. geäußerte Vermutung, daß

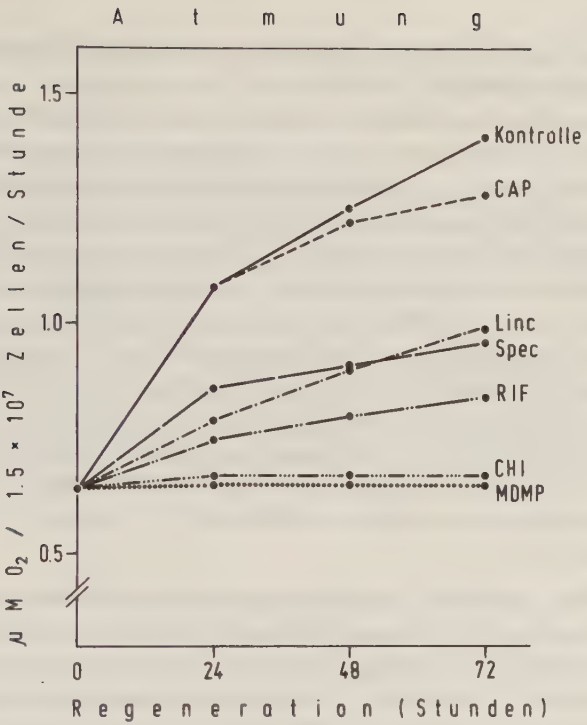


Fig.13 Zunahme der Sauerstoffaufnahme als Maß für die Regeneration der Mitochondrien bei Anzucht mit verschiedenen Antibiotika. Abkürzungen wie in Fig.11.

eine erste erhebliche Steigerung der Photosynthesekapazität der Regeneration des Thylakoidsystems zuzuschreiben ist. Da in der chloramphenicolhaltigen Kultur nur Produkte der cytoplasmatischen Proteinsynthese zur Verfügung stehen, ist dies ein weiterer Beleg dafür, daß die in dieser Entwicklungsphase benötigten Struktur- und Funktionsproteine zur Regeneration der Chloroplastenmembranen ausschließlich vom Cytoplasma her angeliefert werden. Nach Erreichen dieses Entwicklungsstadiums läßt sich die Photosynthesekapazität nur noch mäßig steigern. Ein Grund dafür muß in der gegenüber der Kontrolle

um 80- bzw. 90%-igen Reduktion der Neusynthese an Pigmenten gesehen werden.
Ein weiterer wichtiger Gesichtspunkt ergibt sich aber zusätzlich insofern, als für Chlamydomonas die Existenz von Polypeptiden auch plastidären Ursprungs als Bestandteile beider Photosysteme in einer neueren Arbeit beschrieben wurden (Bar - Nun u. Ohad, 1977). Einen parallelen Befund lieferten Börner et al. (1975) durch Studien an Plastom- und Kernmutanten von Hordeum und Lycopersicon indem sie zeigten, daß der Chlorophyll-Protein-Komplex I sowohl im einen wie im anderen Fall elektrophoretisch nicht mehr nachweisbar war. Überträgt man diese an anderen Organismen gewonnenen Ergebnisse auf Rhodella, so kann unter der Voraussetzung, daß im Rotalgensystem die gleichen Verhältnisse vorliegen, die nach Komplettierung des Thylakoidsystems nur bis zu einem gewissen Punkt regenerierbare Photosynthesekapazität im Fehlen von plastidären Proteinen zum Aufbau neuer Chlorophyll-Protein-Komplexe gesehen werden.

Ähnlich liegen die Dinge in Bezug auf die Regeneration der Hill-Aktivität (Fig.12). Auch für reine Photosystem II - Aktivität ist eine deutliche Inhibierung der Leistungssteigerung gegenüber der Kontrolle zu beobachten. So beträgt die Photosystem II - Regeneration mit Chloramphenicol nach 72 Stunden ca. 50% des Kontrollwertes, während die Gesamt-Photosynthese-Steigerung nur 38% ausmacht.
Auch Gurevitz, Kratz u. Ohad beschrieben 1977, daß die Entwicklung von Photosystem II in Euglena der kontinuierlichen de novo Synthese von Polypeptiden bedarf, die durch Chloramphenicol hemmbar ist. Die gleiche Chloramphenicol-Sensibilität wurde auch für die Steigerung der Hill-Aktivität in Chlamydomonas reinhardi ac-20 nach Überführung der Zellen von mixotropher in phototrophe Kultur bekannt (Goodenough u. Levine, 1971). Detailierte Untersuchungen an Chlamydomonas y-1 führten zu dem Ergebnis, daß die Photosystem II-Präparation zwei Polypeptide plastidären Ursprungs und drei Hauptpolypeptide cytoplasmatischen Ursprungs enthält, während die Photosystem I-Präparation zwei Polypeptide chloroplasteneigener- und ein Polypeptid cytoplasmatischer Proteinsynthese umfaßt (Bar-Nun u. Ohad, 1977).
Die mit Chloramphenicol größere prozentuale Regenerationsfähigkeit der Photosystem II-Reaktion (Fig.12) in Rhodella gegenüber der Gesamt-

photosynthese (Fig.11), die beide Photosysteme umfaßt, ist daher möglicherweise darin zu sehen, daß die Photosystem I-Reaktion durch relativ größeren Mangel an Polypeptiden plastidären Ursprungs stärker betroffen ist.

Während die Wirkung von Chloramphenicol auf die Regeneration der Pigmente und parallel dazu auf die Steigerung der Photosynthesekapazität deutlich erkennbar ist, wird die Atmungsrate während des gleichen Zeitraums nur geringfügig betroffen (Fig.13).
Bei der eingesetzten sehr geringen Konzentration von 10 ug/ml Chloramphenicol wird also garantiert, daß die Effekte auf den Chloroplasten weit größer sind als auf das mitochondriale System. Damit kann gleichzeitig der Verdacht ausgeräumt werden, daß die Wirkung von Chloramphenicol als Sekundäreffekt durch Blockierung der Zellatmung hervorgerufen wird.

Die in vivo Spezifität der Chloramphenicol-Wirkung ist hin und wieder angezweifelt worden. Die Zweifel rühren daher, daß verschiedene Arbeiten zur Synthese von Enzymen sowohl bei Algen als auch in Höheren Pflanzen zu unterschiedlichen Ergebnissen führten.
Auch eine ionophore Wirkung von Chloramphenicol wurde beschrieben, so die Inhibierung der Sulfataufnahme (Ellis, 1963).
Es gibt eine weitere Schwierigkeit verbunden mit der Wirkung von Chloramphenicol auf das proteinsynthetisierende System der Plastide. Diese betrifft das Fehlen von Resistenz auf ribosomaler Ebene.
Für eine Reihe anderer Antibiotika, die den gleichen Hemmeffekt wie Chloramphenicol zeigen, sind Mutanten, resistent auf der Basis der Ribosomen, beschrieben worden. Dies gilt z.B. für Spectinomycin, welches besonders häufig bei Arbeiten an Grünalgen eingesetzt wurde, sowie für Lincomycin, welches sich als spezifischer Inhibitor vor allem bei Höheren Pflanzen bewährt hat.
Zur Überprüfung der mit Chloramphenicol ermittelten Ergebnisse wurden daher diese beiden Antibiotika zusätzlich eingesetzt.

3.8.3. Pigmentanalytische und funktionelle Daten zur Wirkung von Lincomycin und Spectinomycin während der Regeneration.

Lincomycin tritt in Interaktion mit der großen ribosomalen Untereinheit (Chang, Sih u.Weisblum, 1966). Es verhindert die Knüpfung der Peptidbindung durch Blockierung der Anlagerung des 3'-terminalen Endes des Substrates an die Donor- sowie die Acceptorseite des Peptidyl-Transferase-Zentrums (Celma, Monro u. Vazquez, 197o;1971).

Die Resistenz gegenüber Spectinomycin beruht auf einer Mutation, welche die 30S-Untereinheit betrifft und speziell eine Veränderung im Protein P4 herbeiführt (Bollen et al.,1969). Es wird vermutet, daß dadurch die Translokation betroffen wird, weil das Protein (heute S5) mit der EFT- und EFG-abhängigen GTP-ase-Aktivität verknüpft ist (Marsh u. Parmeggiani,1973).

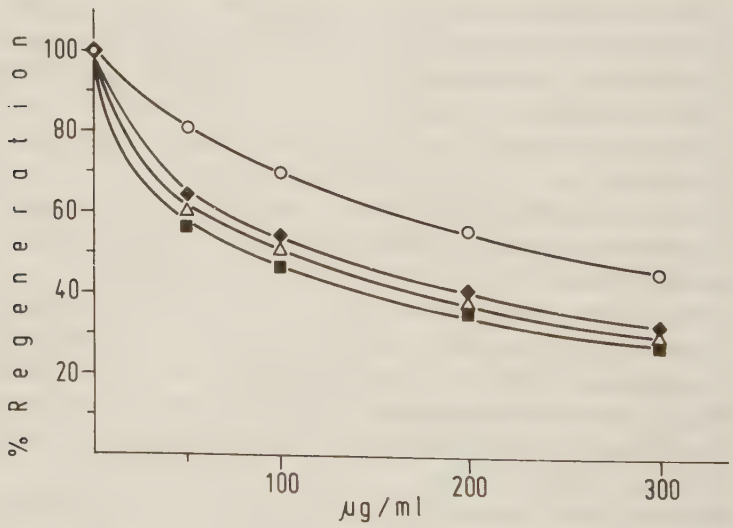


Fig.14 Dosiseffektkurven der Wirkung von Lincomycin auf die Pigmentakkumulation nach 72-stündiger Regeneration nach N-Mangel. Als Bezugswerte dienen die der Normalregeneration in Fig.4. Auch Symbole wie in Fig.4.

Die Akkumulation von Chlorophyll und Biliproteiden nach 72-stündiger Regeneration in Anwesenheit von Lincomycin zeigt Fig.14.
In dieser Darstellung sind die Raten der Pigmentsynthese in Abhängigkeit von verschiedenen Inhibitor-Konzentrationen als Prozentwerte der Normalregeneration aufgetragen. Die resultierenden Kurven zeigen einen ähnlichen Verlauf wie nach Einwirkung von Chloramphenicol (Fig.9).
Auch hier ist mit steigender Antibiotika-Konzentration eine gleichmäßige prozentuale Reduktion der Regeneration der Einzelpigmente zu beobachten, wobei die Hemmung der Bildung der Biliproteidkomponenten in stärkerem Maße erfolgt. Ein deutlicher Unterschied aber zur Wirkung von Chloramphenicol ergibt sich insofern , als für den gleichen Effekt auf die Pigmentsynthese entschieden höhere Konzentrationen an Lincomycin eingesetzt werden müssen. So sind zur Hemmung der Biliproteidregeneration um 70% 300 ug/ml Lincomycin nötig. Parallel dazu erfährt der Chlorophyllanteil eine Reduktion der Neubildung um 55%.

Spectinomycin wurde in zwei verschiedenen Formen eingesetzt. Dabei handelt es sich um Spectinomycin-dihydrochlorid-pentahydrat (siehe 2.3.6.) sowie um Spectinomycin-sulfat. Da in der Literatur nur die Bezeichnung Spectinomycin verwendet wird, möglicherweise aber das mit den beiden Formen vorgegebene andersartige Ionenmilieu zur Verstärkung bestimmter Effekte führen kann, wurden beide Salze nebeneinander auf ihre Wirkung untersucht. Die eingesetzten Konzentrationen beziehen sich dabei auf die Menge an Spectinomycin-Base.

Die Dosiseffektkurven dieser beiden Substanzen in den Figuren 15 und 16 zeigen einen gleichartigen Verlauf, wobei kleine relative Verschiebungen der Werte der Einzelpigmente der Mittelwertbildung aus mehreren Messungen zuzuschreiben sind.
Da also mit beiden Wirkformen von Spectinomycin in Rhodella die gleichen Effekte erzielt werden, genügt es, weiterhin nur von der Spectinomycin-Wirkung zu sprechen. Die Kurve der Pigmentregeneration bei Einwirkung von Spectinomycin zeigt einen andersartigen Verlauf als bei der Chloramphenicol- und Lincomycin-Wirkung beschrieben. Die Verbindung der Meßpunkte jedes Einzelpigments miteinander liefert nahezu eine Gerade, deren Verlängerung über das Maß bei 300 ug/ml hinaus eine quantitative Hemmung der Pigmentregeneration erwarten läßt. Die

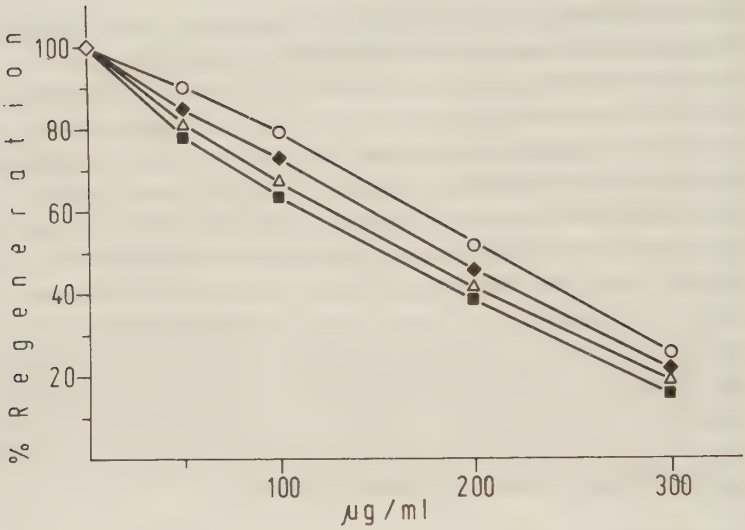


Fig.15 Dosiseffektkurven der Wirkung von Spectinomycin-dihydrochlorid-pentahydrat auf die Pigmentakkumulation nach 72-stündiger Regeneration nach N-Mangel.

Konzentration von 300 ug/ml Spectinomycin führt zu einer 80%-igen Hemmung der Biliproteidakkumulation sowie zu einer Reduktion der Chlorophyllbildung um 75%.

Grundsätzlich kann also festgestellt werden, daß die Experimente mit Lincomycin und Spectinomycin die Ergebnisse mit Chloramphenicol insofern stützen, als auch bei deren Einsatz eine deutliche Abhängigkeit der Pigmentakkumulation vom proteinsynthetisierenden System der Plastide demonstriert werden kann. Unterschiede ergeben sich hingegen hinsichtlich der benötigten Antibiotika-Konzentrationen, um annähernd gleiche Effekte zu erzielen. So sind sich 10 ug/ml Chloramphenicol und 300 ug/ml Spectinomycin in ihrer Hemmwirkung auf Rhodella-Kulturen gleichwertig. Unterschiede in der Wirksamkeit von Lincomycin und Spectinomycin fand Ellis (1970) bei Untersuchungen zur Aminosäure-

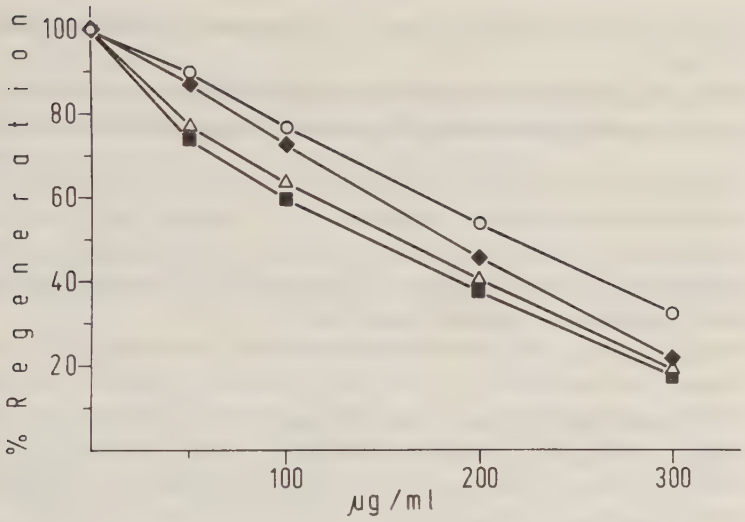


Fig.16 Dosiseffektkurven der Wirkung von Spectinomycin-sulfat auf die Pigmentakkumulation nach 72-stündiger Regeneration nach N-Mangel.

inkorporation isolierter Chloroplasten der Bohne. Bei gleicher Inhibitorkonzentration von 200 ug/ml wurde die Inkorporation von ^{14}C-Leucin durch Spectinomycin um 90%, durch Lincomycin nur um ca. 65% gehemmt. Die an Rhodella gewonnenen Ergebnisse bestätigen diese unterschiedliche Effektivität auch im Rotalgensystem. Die im Inhibitorversuch an Rhodella benötigten Antibiotika-Konzentrationen an Lincomycin und Spectinomycin liegen erheblich über denen von Chloramphenicol.
Zum Verständnis dieser Tatsache muß hier kurz auf die Frage der Effektivität der Antibiotika in Abhängigkeit von Konzentration und Objekt eingegangen werden. Entscheidend für die Wirkung eines Antibiotikums ist dessen intrazelluläre Konzentration, die abhängig ist von der Permeationsrate über die Membranen. Mit dem Nährmedium verabreichtes ^{14}C-Chloramphenicol dringt z.B. nur zu 1-2% in die Zellen von Euglena gracilis ein (Matson u. Kimura, 1976).
Deutliche Unterschiede in der Wirksamkeit von Antibiotika an isolier-

ten Chloroplasten höherer Pflanzen verschiedener Herkunft fand Ellis (1970).
Diese Tatsachen lassen die unterschiedliche Effektivität von Linco- und Spectinomycin gegenüber Chloramphenicol verständlich erscheinen.

Auch an dieser Stelle ist wiederum der Einwand möglich, daß die Wirkung der Antibiotika evtl. vorgetäuscht bzw. verstärkt wird durch einen Ausfall der mitochondrialen Atmung. Daher wurden Atmungsmessungen an den verschiedenen Kulturen vorgenommen und mit den entsprechenden Photosynthesemessungen verglichen.
Die Regeneration der Photosynthesekapazität bei Einwirkung von 300 ug/ml Linco- und Spectinomycin wird in Fig.11 vorgestellt. Wie ein Vergleich der Sauerstoffentwicklung in den chloramphenicol- und lincomycinhaltigen Kulturen nach 72-stündiger Regeneration zeigt, kommen die Meßwerte nahezu zur Deckung. Sie liegen dabei insgesamt über denen von Spectinomycin. Die hier im Vergleich zu der Kontrolle angezeigte Einschränkung der Regenerationsfähigkeit des Photosyntheseapparates liegt im Rahmen der in 3.8.2. und oben beschriebenen Effekte.

Das gleiche gilt für den Vergleich der Regeneration der Photosystem II-Aktivitäten (Fig.12).

Anders liegen die Verhältnisse bei der nach 72 Stunden erreichten Regeneration der mitochondrialen Atmungskapazität (Fig.13). Während die Sauerstoffaufnahme in chloramphenicolhaltigen Kulturen gegenüber der Kontrolle kaum reduziert wird, schränken die beiden Wirkstoffe Linco- und Spectinomycin die Atmung der Mitochondrien gegenüber Chloramphenicol stärker ein.
Vergleicht man aber die prozentualen Verhältnisse von Photosynthese und Atmung miteinander, so kann in allen Fällen ein verstärkter Effekt auf den erstgenannten Prozeß beobachtet werden. So wird mit Lincomycin die Photosynthese um ca. 15%, mit Spectinomycin hingegen um 80% stärker betroffen als die Atmung. Wenn daher eine deutliche Inhibierung der Regeneration der Mitochondrien mit Lincomycin und Spectinomycin vorliegt, so kann doch die damit verbundene reduzierte Anlieferung von energiereichem ATP nicht alleine für die Effekte auf die Plastide verantwortlich gemacht werden. Auch von dieser Seite gesehen erlauben daher die Ergebnisse mit Linco- und Spectinomycin eine Bestätigung der

in 3.8.2. beschriebenen Befunde.

Weiteren Aufschluß sollte ein Vergleich der Feinstruktur der Plastiden nach Chloramphenicoleinwirkung (Abb.20) mit der in Anwesenheit von Lincomycin und Spectinomycin liefern (Abb.21-25).

3.8.4. Elektronenmikroskopische Befunde zur Wirkung von Lincomycin und Spectinomycin auf die Regeneration der Plastide nach N-Mangel.

Plastidenausschnitte nach 72-stündiger Regeneration unter Einwirkung von 300 ug/ml Spectinomycin (Abb.21) und -Lincomycin (Abb.22) zeigen in allen wesentlichen Punkten Übereinstimmung mit dem Bild, das nach Regeneration in Anwesenheit von 10 ug/ml Chloramphenicol gewonnen wurde (Abb.20). Die Gemeinsamkeiten betreffen sowohl die vollständige flächenmäßige Regeneration der Plastide (nicht gezeigt), als auch die Vervollständigung des Thylakoidsystems. Auch nach Einwirkung von Spectinomycin und Lincomycin sind die Thylakoide entsprechend ihrem Kontrastierungsverhalten vollständig regeneriert und zeigen einen äquidistanten Verlauf mit senkrechten Entfernungen um 40 nm. Entsprechend dem Befund nach Chloramphenicolbehandlung fehlen auch hier nach 72-stündiger Regeneration Phycobilisomen auf den stromaseitigen Thylakoidmembranen. Plastidenribosomen und DNA-Zentren sind hingegen nachweisbar.

Während diese Punkte für alle elektronenmikroskopischen Aufnahmen aus spectinomycinbehandelten Kulturen ohne Einschränkungen zutreffen, wird nach Lincomycin-Einwirkung in Bezug auf das Thylakoidsystem eine Veränderung beobachtet.
Ein Teil der im Querschnitt in Vielzahl anzutreffenden Plastidenteile zeigt nicht mehr den gewohnten Aufbau, sondern erscheint frei von Thylakoiden und ist angefüllt mit granulärem Material (Abb.23). Aufgrund der diese membranfreien Bereiche umhüllenden Doppelmembran können sie eindeutig als Plastidenmatrix identifiziert werden. Wie in Abb.23 weiter sichtbar, sind in einigen randlichen Bereichen auch weiterhin Thylakoide vorhanden, wenn auch gegenüber dem gewohnten Bild in untergeordnetem Maße. Auffallend sind die vom Cytoplasma

ausgehenden Einstülpungen der Chloroplastenhülle, die blasenförmig in die Matrix hineinragen und mit fibrillärem Material angefüllt erscheinen. Entsprechend der zufälligen Schnittführung durch die Zelle können weitere Aspekte veränderter Plastidenbereiche beobachtet werden. So lassen sich in Teilen der gelappten Plastide kollabierte Thylakoidformationen nachweisen, die denen der N-Mangelkultur entsprechen, oder noch dichter zusammengelagert sind (Abb.24a). Während aber im N-Mangelzustand die kollabierten Thylakoide wellenförmig den zentralen Matrixbereich durchziehen (Abb.7), sind sie nach Lincomycin-Behandlung im Querschnitt kreisförmig geschlossen und rollenförmig ineinander verschachtelt. Sie entsprechen damit dem Bild, wie es für Chromoplasten vor allem aus Blüten der gelben Narzisse bekannt geworden ist (Liedvogel, Sitte u. Falk,1976). Es liegt daher nahe zu vermuten, daß die Plastidenteile in Abb.24a mit ihrem deformierten Thylakoidsystem das Anfangsstadium von Abbauvorgängen von Chloroplastenmembranen repräsentieren. Als weiterer Schritt in dieser Richtung mag die Abb.24b angesehen werden, in der keine distinkten Thylakoidmembranen mehr nachweisbar sind, sondern innerhalb eines großen freien Matrixbereiches eine inhomogene granuläre Masse deponiert ist.

Daneben fällt die feinstrukturelle Veränderung der DNA-Zentren auf. Erscheint das DNA-Material des Chloroplasten im Normalfall in verschlungener, feinfädiger Form (Abb.2;12), so sind nach Behandlung mit Lincomycin in den entsprechenden Zentren grobe, verdickte Stränge nachweisbar, die aufgrund ihrer Lage und z.t. noch vorhandener Verfilzung als DNA-Material angesprochen werden können (Abb.25). Inwieweit solche bislang für Lincomycin nicht bekannten Effekte an der DNA auch ursächlich mit der Thylakoiddegeneration zusammenhängen, konnte hier nicht sicher entschieden werden. Immerhin treten die gleichen Effekte am Thylakoidsystem auch nach Behandlung der Zellen mit Rifampicin auf, einem Inhibitor der Transscription an der DNA der Plastide (siehe 3.11.2.).
Lincomycin erweist sich daher gegenüber Chloramphenicol und Spectinomycin als weniger geeignet, im Rotalgensystem als spezifischer Inhibitor der Translation an Chloroplastenribosomen in vivo zu fungieren.

Da aber die gleichen Effekte auf die Regeneration der Plastide und ihrer Komponenten mit Chloramphenicol in geringerer Konzentration als mit

Spectinomycin erzielt werden können, erweist sich dieses Antibiotikum in Rhodella als am besten geeignet. Dies um so mehr, als parallel zu der Wirkung auf die Plastide das mitochondriale System nicht geschädigt wird. In weiterführenden Untersuchungen kommt daher nur noch Chloramphenicol zum Einsatz (siehe 3.10.).

3.9. Untersuchungen zur Regeneration der Kulturen nach Entfernung der Antibiotika durch Waschung.

Die mit den bisherigen Untersuchungen zur Regeneration der Pigmente und des Thylakoidsystems beim Antibiotikaeinsatz vorgenommenen Atmungsmessungen dienten dazu, eine hinreichende ATP-Versorgung der Zelle für Syntheseleistungen während der Regeneration zu sichern, um damit mögliche Sekundäreffekte der Antibiotikawirkung ausschließen zu können.
Wie aber hinreichend bekannt ist, können spezifische Reaktionen sogar noch an Partikelpräparationen bestimmter Organellen vorgenommen werden. Es galt daher zu sichern, daß die mit dem Antibiotikaeinsatz verbundene Hemmung bestimmter Komponenten während des notwendigen mehrtägigen Einsatzes nicht zum Zelltod führt. Von besonderer Bedeutung waren dabei die Untersuchungen für solche Kulturen, die während des Antibiotikaeinsatzes keine oder nur geringe Regeneration in Bezug auf Komponenten der Plastide zuließen. Dies gilt besonders für die Kulturen nach Behandlung mit Cycloheximid und MDMP. Aus diesem Grunde wurde deren Regenerationsfähigkeit nach Entfernung der Inhibitoren besondere Aufmerksamkeit geschenkt.

Zur Überprüfung der aufgeworfenen Fragen wurden die Zellkulturen nach Beendigung der Regenerationsstudien mehrmals gründlich in sterilem Nährmedium gewaschen und anschließend in antibiotikafreiem ,

frischem Nährmedium resuspendiert. Als Maß für die Überlebensfähigkeit der Zellen diente die im Vergleich zur Normalregeneration während des gleichen Zeitraums stattfindende Pigmentsynthese.
Da nach Waschung der Kulturen in allen untersuchten Fällen die relative Pigmentsynthese für alle Komponenten gleichmäßig erfolgte, ähnlich den Verhältnissen in Fig.4, wird als Maß der Pigmentregeneration wegen der Übersichtlichkeit wahlweise nur der Anteil des Phycoerythrin-Gehaltes der Kultur herausgegriffen (Fig.17). Zum einfachen Vergleich mit der Kontrolle sind die Werte der Normal-Regeneration zusätzlich eingetragen. Für alle Kulturen wurde der Phycoerythrin-Gehalt stets auf $1x10^6$ Zellen/ml bezogen und anschließend als Prozentwert des Gehaltes der Normalkultur aufgetragen.

Wie der Vergleich mit der Kontrolle zeigt, werden innerhalb der ersten 24 Stunden nach Waschung von Cycloheximid nur Spuren von Phycoerythrin neu synthetisiert. Während der folgenden Belichtungsperiode steigt der Pigmentgehalt hingegen deutlich an und erreicht nach 72 Stunden nahezu den Wert der Kontrolle. Im Gegensatz dazu ist nach Entfernung von MDMP aus der Kultur keine lag-Phase zu registrieren, der Pigmentgehalt steigt vielmehr im gleichen Maße wie in der Kontrolle an. Dieser Unterschied spricht dafür, daß MDMP schneller aus den Zellen ausgewaschen werden kann, wie auch dessen schnellere Aufnahme aus elektronenmikroskopischen Aufnahmen anzunehmen ist (siehe 3.7.3.).
Im weiteren Verlauf der Regeneration wurden die Pigmentbildungsraten der Kontrolle sogar noch etwas übertroffen. Diese Synthesesteigerung über das Maß der Normalregeneration hinaus kann damit begründet werden, daß während der 72-stündigen Vorinkubation die plastidäre Proteinsynthese Produkte zur Verfügung stellt, die nach Auswaschen des Inhibitors cytoplasmatischer Synthese unmittelbar verwertet werden können und somit dieser Kultur gegenüber der Kontrolle einen Vorteil bieten.
Obwohl also nach Waschung von Cycloheximid und MDMP quantitative und zeitliche Unterschiede in der Regeneration der Pigmente sichtbar werden, lassen beide Ergebnisse faktisch den Schluß zu, daß mit deren Einsatz die Vitalität der Zellen nicht beeinträchtigt wird. Vergleichende lichtmikroskopische Untersuchungen zeigen ferner, daß sämtliche Zellen der Kultur zu erneuter Pigmentbildung in der Lage sind.

Einschneidende unspezifische Veränderungen von Zellkomponenten

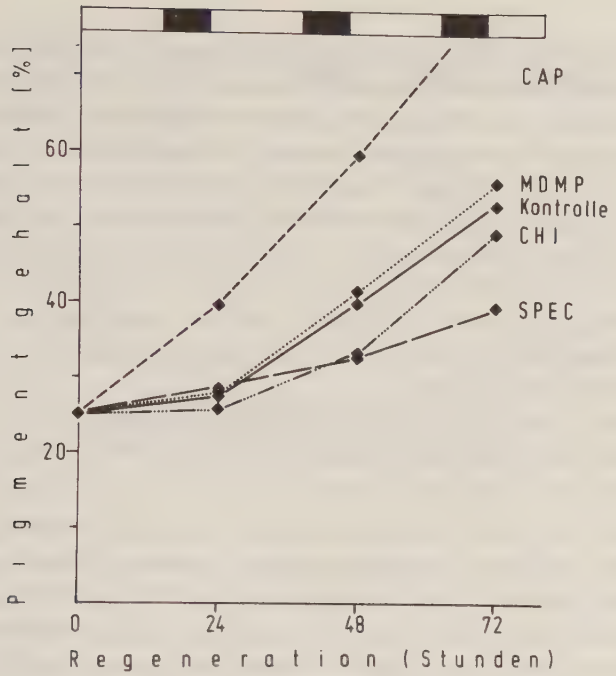


Fig.17 Überprüfung der Regenerationsfähigkeit der Zellen nach 72-stündiger Einwirkung von Antibiotika. Die Zellen wurden mehrmals gründlich in sterilem Nährmedium gewaschen und anschließend in antibiotikafreiem, sterilem Nährmedium resuspendiert.
Phycoerythrinsynthese nach Waschung der Kulturen im Vergleich zur Normalregeneration (Kontrolle). Pigmentgehalt bezogen auf die Normalkultur.

während des Einsatzes dieser beiden Inhibitoren cytoplasmatischer Proteinsynthese wurden nicht beobachtet.

Die Regeneration der Pigmentneusynthese nach Waschung von Chloramphenicol zeigt einen völlig anderen Verlauf.
Schon nach den ersten 24 Stunden sind ca. 20% des abgebauten Phycoerythrins

neu synthetisiert. Danach wird die Pigmentbildungsrate weiterhin weit über das Maß der Normalregeneration hinaus gesteigert. Mußten hier nach Überführung der Zellen aus nitratfreiem Medium in die Vollnährlösung sämtliche Protein-Synthese-Prozesse erst neu anlaufen, so werden während 48-bzw. 72-stündiger Regeneration in Anwesenheit von Chloramphenicol die Produkte der cytoplasmatischen Proteinsynthese zur Komplettierung des Thylakoidsystems und der flächenmäßigen Regeneration der Plastide zur Verfügung gestellt.
Insofern erscheint es nicht verwunderlich, daß nach Entfernung des Inhibitors plastidärer Synthese bevorzugt dringend benötigte Pigmente akkumuliert werden.
Daß dies aber in dem in Fig.17 ersichtlichen Maße geschehen kann, weist auf eine spezifische Reaktion von Chloramphenicol hin und belegt weiterhin die volle Vitalität der Zellen.

Im Gegensatz hierzu kann nach Entfernung von Spectinomycin die Pigmentsynthese nur langsam gesteigert werden. Ob dies auf mögliche Schädigungen von Zellkomponenten zurückzuführen oder einer stärkeren ribosomalen Bindung zuzuschreiben ist, konnte bislang nicht entschieden werden. Empfehlenswerter erscheint jedenfalls der Einsatz von Chloramphenicol als Inhibitor der plastidären Proteinsynthese.

3.10. Untersuchungen zur Wirkung von Inhibitoren der Proteinsynthese bei sukzessivem Einsatz.

Während nach den bisherigen Untersuchungen die Abhängigkeit der Plastidendifferenzierung nach N-Mangel vom proteinsynthetisierenden System der Plastide und des Cytoplasmas für das Rotalgensystem erfaßt werden konnte, blieb die Frage nach der Lokalisation von Pigmentsyntheseorten noch offen.

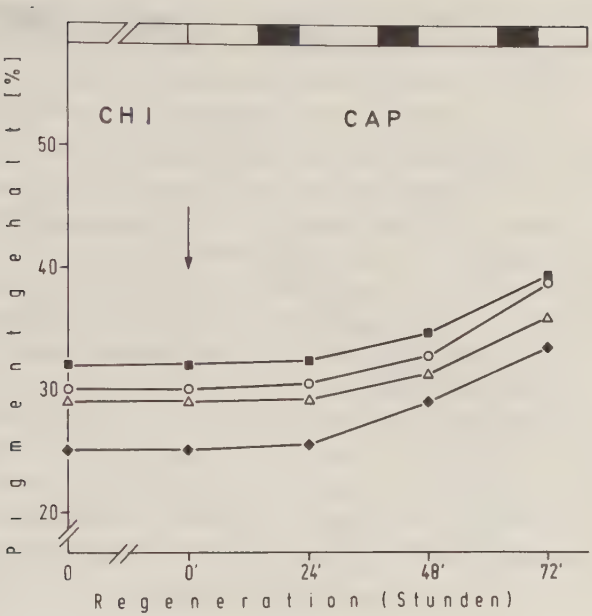


Fig.18 Pigmentregeneration nach 72-stündiger Vorinkubation mit Cycloheximid (0 bis 0') und Resuspendierung in frischem, chloramphenicolhaltigem Nährmedium (0' bis 72'). Zwischengeschaltete Waschungen (⟶). Symbole wie in Fig.4 . Abkürzungen wie in Fig.11. Pigmentgehalt bezogen auf Werte der Normalkultur.

So konnte sowohl mit Inhibitoren der cytoplasmatischen- als auch mit solchen der plastidären Proteinsynthese die Neubildung von Chlorophyll a wie die der Biliproteide gehemmt werden.
Beide Syntheseorte liefern also Produkte , die für die Pigmentakkumulation unentbehrlich sind.
Wie in Fig.17 ersichtlich, resultiert nach Entfernung der Antibiotika Cycloheximid und Chloramphenicol durch Waschung eine quantitativ unterschiedliche Biliproteidregeneration, die als Ausdruck einer unter-

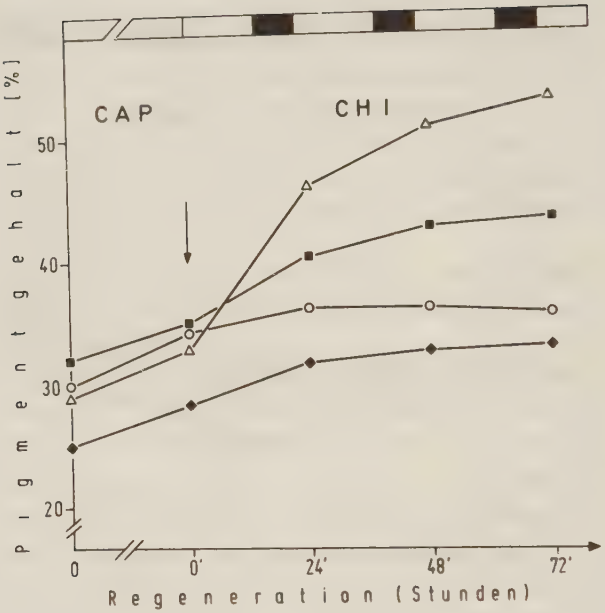


Fig. 19 Pigmentregeneration wie in Fig. 18, aber in der Reihenfolge umgekehrter Antibiotika-Einsatz.
Chloramphenicol-Vorinkubation (0 bis 0'), nach Waschung Resuspendierung in cycloheximidhaltigem Nährmedium (0' bis 72').

schiedlichen Bedeutung der cytoplasmatischen und plastidären Syntheseorte gewertet werden kann. Die bislang in ihrer Bedeutung für die Biliproteidakkumulation alternativ untersuchten Syntheseorte sollten daher in einem erweiterten experimentellen Ansatz kombiniert geprüft werden. Hierzu wurde nach Vorinkubation der Zellen mit dem ersten Inhibitor und anschließender Waschung gleichzeitig mit der Überführung in frisches Nährmedium der zweite Wirkstoff appliziert.
Die Ergebnisse dieser Experimente sind in den Figuren 18 und 19 festgehalten, wobei wiederum als Bezugsgröße der Pigmentgehalt der Normalkultur dient. Die während der ersten 72-stündigen Vorinkubation akku-

mulierte Pigmentmenge ist in dem unterbrochenen Zeitintervall (0 bis 0') eingetragen. Die Pigmentsyntheserate in dieser Phase stimmt erwartungsgemäß mit den Daten überein, die sich in den Versuchsgruppen entsprechend Fig.7 bzw. Fig.10 ergeben hatten.

Wie in Fig.18 ersichtlich ist, erfolgt nach Vorinkubation mit Cycloheximid und nachfolgender Waschung und Resuspendierung in frischem, chloramphenicolhaltigem Nährmedium eine stufenweise Steigerung der Pigmentbildung. Dies zeigt an, daß die Zellen in der Lage sind, nach dieser Vorbehandlung den Einfluß von Chloramphenicol deutlich zu unterlaufen. Während nämlich im Chloramphenicolversuch nach Fig.10 nach 72-stündiger Regeneration nur eine geringfügige Biliproteidakkumulation beobachtet werden konnte, ist diese unter den vorliegenden Bedingungen innerhalb des gleichen Zeitraums erheblich gesteigert. Chlorophyll- und Biliproteidbildung setzen dabei in den ersten 24 Stunden sehr zögernd ($<1\%$) ein, steigern sich dann und erreichen nach 72 Stunden mit ca. 12 ug/ml Biliproteid knapp 30% des bei normaler Regeneration akkumulierten Biliproteids (Fig.18). Hierbei werden die Einzelkomponenten prozentual etwa gleichmäßig regeneriert.

Der in der Reihenfolge umgekehrte Antibiotikaeinsatz in Fig.19 führt zu völlig andersartigen Ergebnissen. Wie aus dem Kurvenverlauf der Pigmentsynthese ersichtlich ist, erfolgt ein massiver Pigmentschub während der ersten 24 Stunden nach Auswaschen von Chloramphenicol. Hierbei werden mengenmäßig über 60% des insgesamt in 72 Stunden regenerierten und akkumulierten Biliproteidmaterials angeliefert. Im weiteren Verlauf der Regeneration in Anwesenheit von Cycloheximid kommen die Bildungsprozesse zum Erliegen.

Der überproportionale Anstieg des Biliproteidgehaltes in Gegenwart von Cycloheximid nach Vorinkubation in chloramphenicolhaltigem Nährmedium verdient besonderes Interesse. Er kann als ein Indiz dafür gewertet werden, daß entscheidende Komponenten für die Biliproteidanreicherung während der Vorinkubationszeit an cytoplasmatischen Ribosomen in hinreichendem Maße synthetisiert, aber erst nach Fortfall der Hemmung durch Chloramphenicol spektralphotometrisch nachweisbar werden. Umgekehrt kann die Gegenwart von Chloramphenicol im inversen Experiment in Fig.18 nicht die stetig zunehmende Biliproteidakkumulation

nach Auswaschen von Cycloheximid aufhalten.

Nach diesen Ergebnissen können für die Synthese der Apoproteine der Biliproteide die plastidären Ribosomen wohl kaum in Frage kommen.

Innerhalb der Biliproteidregeneration in Fig.19 wird C-Phycocyanin dominierend akkumuliert; es erreicht ausgehend von knapp 33% nach der Waschung innerhalb 72-stündiger Regeneration bereits 53% der Normalkultur.Bemerkenswerterweise werden nach Überführung chloramphenicol-gehemmter Zellen in antibiotikafreies Medium nach 3.9. alle Biliproteide prozentual gleichmäßig regeneriert.

Die in den hier beschriebenen beiden Experimenten demonstrierte Verschiedenartigkeit der Biliproteidregeneration hat in keiner Phase zu einer Diskrepanz zwischen Apoprotein- und Phycobilinsynthese geführt; wenigstens wurden nie Phycobiline in analytisch faßbarer Menge freigesetzt, sondern stets nur Biliproteid spektralphotometrisch nachgewiesen. Die Biliproteidbildung unterliegt damit Regulationsvorgängen, in denen Cytoplasma und Plastide eng miteinander gekoppelt arbeiten dürften. Eine direkte Regulation der Phycobilinsynthese durch angeliefertes Apoprotein kann erwartet werden, bedarf aber noch weiterer Untersuchungen.

3.11. Untersuchungen zur Bedeutung der plastideneigenen DNA für die Regeneration von Rhodella nach N-Mangel.

Bei der nachgewiesenen Abhängigkeit der Pigmentakkumulation von der Translation in der Plastide erhebt sich die Frage, ob gleichzeitig auch die DNA des Chloroplasten als Informationsträger in Bezug auf die aufgeworfenen Fragen von Bedeutung ist.
Dies ist nicht selbstverständlich erforderlich, da grundsätzlich vier mögliche Kombinationssysteme von Transscription und Translation für Chloroplastenkomponenten ins Auge zu fassen sind:

1. Chloroplasten DNA-Transscription -- Chloroplasten-Translation
2. Chloroplasten DNA-Transscription -- Cytoplasma-Translation
3. Kern DNA-Transscription -- Chloroplasten-Translation
4. Kern DNA-Transscription -- Cytoplasma-Translation

Rifamycine sind starke Hemmstoffe der DNA-gesteuerten RNA-Synthese in Bakterien (Hartmann et al., 1967), während sie die DNA-abhängigen DNA-Synthesen auch bei höheren Konzentrationen in vitro nicht beeinträchtigen. Dieses Ergebnis sprach dafür, daß die Rifamycine nicht die DNA-Matrize angreifen, sondern vielmehr mit der RNA-Polymerase einen sehr stabilen Komplex bilden, was mit simultanem Verlust der Aktivität verbunden ist (Wehrli et al., 1968).
Als besonders wirksam erwies sich dabei das von der italienischen Firma Lepetit entwickelte Derivat des Rifamycins SV, bei dem auf synthetischem Weg der Wasserstoff in der 3-Stellung des Naphthalinrings durch einen N-Methylpiperazinyl-iminomethyl-Rest substituiert ist (Fig.20). Dieses Produkt erhielt den Namen Rifampicin (USA: Rifampin).

Untersuchungen haben gezeigt, daß Rifampicin durch seine Assoziation mit dem Enzym im Verhältnis 1:1 dessen korrekte Anlagerung an die DNA verhindert (siehe Wehrli, 1977). Resistenz gegenüber Rifampicin liegt in der Polymerase selbst begründet (Hayward, 1976).

Unwirksam ist Rifampicin gegenüber der RNA-Polymerase pflanzlicher Zellen. Für die hier vorgesehenen Untersuchungen aber von größter Bedeutung ist der Befund, daß durch Versuche mit Chloroplasten aus Grünalgen die Sensitivität der plastidären Polymerase auf Rifampicin-

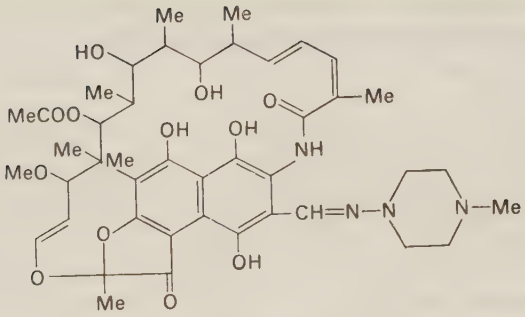


Fig.20 Strukturformel von Rifampicin. Me = Methylgruppe.

Behandlung belegt werden konnte (Surzycki, 1969).
Während die Wirkung auf die Inhibierung der RNA-Ketten Elongation klar der Rifampicin-Wirkung zugeschrieben werden kann, wird der Effekt auf die Initiation noch diskutiert (Yarbrough, Wu u. Wu 1976; Kessler u. Hartmann, 1977). Erwähnenswert ist ferner, daß Rifampicin grundsätzlich nur auf freie RNA-Polymerase einwirkt, während nach erfolgter Kopplung mit der DNA das Enzym resistent gegenüber der Droge ist (Handschin, Wunderli u. Wehrli, 1976).

Zur Konzentrationsabhängigkeit der Rifampicin-Wirkung in vivo liegen für Grünalgen detailierte Untersuchungen vor (Surzycki et al., 1970). So erwiesen sich 300 ug/ml Rifampicin in der Lage, die Inkorporation von ^{14}C-Adenin in RNA ganzer Zellen um 44% zu inhibieren. Dabei konnte gezeigt werden, daß dieser Hemmeffekt dem Ausfall der Synthese in Chloroplasten zuzuschreiben ist.
Rifampicin ist also in der Lage, auch in vivo spezifisch die Informationsübertragung der Plastiden-DNA zu blockieren. Dieser Wirkstoff bot sich daher auch zum Einsatz in Rhodella an.

3.11.1. Pigmentanalytische Daten zur Wirkung von Rifampicin während der Regeneration.

Da für alle untersuchten Grünalgen in vivo eine Rifampicin-Konzentration

um 250 ug/ml eine deutliche Inhibitorwirkung anzeigte, wurde auch für erste Untersuchungen an Rhodella diese Konzentration gewählt. Die Wirkung von Rifampicin auf die Regeneration der Pigmente soll zuerst angesprochen werden und wird in Fig. 21 vorgestellt.

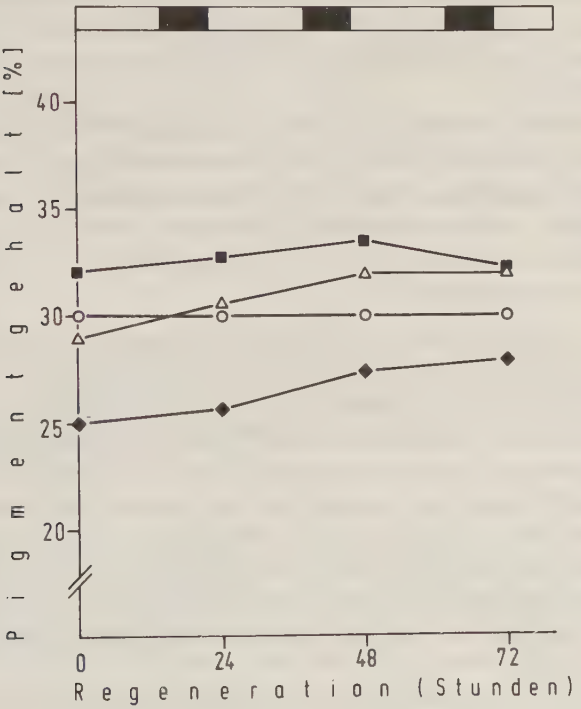


Fig.21 Verlauf der Pigmentregeneration bei Einwirkung von 250 ug/ml Rifampicin auf die Kultur nach N-Mangel. Pigmentgehalt in % der Normalkultur. Symbole wie in Fig.4.

Wie der Verlauf der Pigmentregeneration zeigt, ist die Biliproteidanreicherung nach Einsatz von 250 ug/ml Rifampicin stark betroffen.

Nach anfänglich geringfügigem Anstieg ist nach 48 Stunden die Anlieferung von Biliproteidkomponenten nahezu komplett gehemmt.
Die Synthese von Chlorophyll nach N-Mangel ist sogleich nach Applikation der Droge völlig blockiert.
Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu Befunden an Chlamydomonas, wo mit 250 ug/ml Rifampicin keine Inhibierung der Chlorophyll-Biosynthese beobachtet werden konnte (Surzycki et al., 1970; Armstrong et al., 1971; Ohad, 1974). Auch in Chlorella wird die Synthese von Chlorophyll mit 100 ug/ml nur geringfügig um ca. 36% reduziert (Galling, Salzmann u. Spieß, 1973).
Um dem Einwand konzentrationsabhängiger Nebeneffekte bei hoher Antibiotikagabe zu begegnen, wurde eine Dosiseffektkurve der Rifampicinwirkung im Bereich von 1 ug/ml bis 250 ug/ml aufgestellt (Fig. 22). Damit werden die Inhibitoreffekte von Rifampicin auf die Regeneration der Pigmentkomponenten in % der Normalregeneration nach 72-stündiger Einwirkung zusammengefaßt.

Auffällig ist die über einen weiten Konzentrationsbereich hinweg konstante Regeneration der Biliproteidkomponenten. So wird im Bereich von 25 ug/ml bis 200 ug/ml Rifampicin während der 72-stündigen Regeneration kaum eine Änderung der Pigmentsynthese beobachtet. Die einzelnen Komponenten hingegen erfahren bei Einwirkung des Inhibitors eine unterschiedliche prozentuale Bildungsrate. Während der Phycoerythrin-Gehalt über den ganzen Konzentrationsbereich zu ca. 25% regeneriert wird, erfährt die Phycocyaninbildung eine weitere Absenkung auf ca. 20% der Kontrolle. Der Allophycocyanin-Anteil schließlich vermag bei den gegebenen Bedingungen nur noch zu knapp 15% gegenüber der antibiotikafreien Kultur zu regenerieren.
Während somit im oben genannten Konzentrationsbereich die Biliproteidsynthese keine Änderung erfährt, erfolgt mit zunehmender Antibiotika-Konzentration ab 25 ug/ml eine weitere stetige Erniedrigung der Chlorophyllneubildung. Bei einer Konzentration von 200 ug/ml ist keinerlei Synthese mehr möglich.
Da aber unter den gleichen Verhältnissen die Biliproteid-Akkumulation noch im Mittel zu 20% erfolgt, kann für die Chlorophyllsynthese eine stärkere unphysiologische Belastung angenommen werden. Diese betrifft bei Steigerung der Rifampicin-Dosis auf 250 ug/ml auch die Biliproteidkomponenten, deren anteilsmäßige Bildung ebenfalls stark betroffen wird.

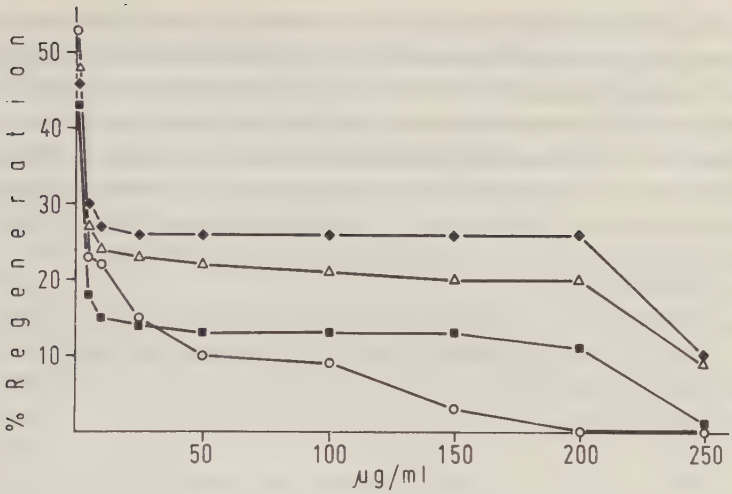


Fig.22 Dosiseffektkurve der Wirkung von Rifampicin auf die Pigmentakkumulation nach 72-stündiger Regeneration nach N-Mangel. Prozentwerte bezogen auf Normal-Regeneration der Fig.4. Auch Symbole wie in Fig.4.

Da wie in Fig.10 ersichtlich nach Behandlung der Kulturen mit Chloramphenicol die Bildung der Biliproteide wie des Chlorophylls in etwa im gleichen Rahmen gehemmt wird, kann unter der Voraussetzung, daß die Plastiden-DNA für beide Komponenten die gleiche funktionelle Bedeutung besitzt, die Erniedrigung des Chlorophyll-Wertes als Sekundäreffekt angesehen werden. Diese Vermutung wird dadurch bestärkt, daß mit 10 ug/ml Rifampicin die Regeneration der Pigmente gleichmäßig betroffen ist.

Der Verlauf der Dosiseffektkurven in Fig.22 im Bereich niedriger Rifampicin-Dosen zeigt, daß schon mit 10 ug/ml Rifampicin gewisse Syntheseleistungen wieder möglich werden und die Konzentration von 5 ug/ml Rifampicin als echte Grenzdosis aufzufassen ist, bei deren Unterschreitung die Hemmwirkung zunehmend aufgehoben wird.

Zusammenfassend kann also festgestellt werden, daß die Behandlung der

Kulturen mit Rifampicin zu einer starken Inhibierung der Biliproteid- wie auch der Chlorophyllakkumulation führt. Dabei werden die einzelnen Biliproteidkomponenten deutlich unterschiedlich betroffen. Der Effekt auf die Chlorophyll-Regeneration liegt dabei in der Höhe des Mittelwertes der Biliproteid-Verhältnisse. Die im Grünalgensystem benötigten Dosen an Rifampicin zum Erreichen deutlicher Hemmeffekte werden in Rhodella nicht benötigt. Vielmehr erweisen sich hier Konzentrationen als ausreichend, die um nahezu zwei Zehnerpotenzen niedriger liegen.
Werden aber unter diesen Bedingungen sowohl die Biliproteid- wie auch die Chlorophyll-Regeneration so gravierend betroffen, so kann von einer klaren Abhängigkeit der Prozesse von der Information der Plastide ausgegangen werden.

3.11.2. Elektronenmikroskopische Befunde zur Wirkung von Rifampicin auf die Regeneration nach N-Mangel.

Die mit höherer Rifampicin-Konzentration erfolgende Erniedrigung der Chlorophyllregeneration wurde oben mit möglichen Sekundäreffekten der Antibiotikawirkung erklärt. Betreffen diese nicht nur biochemische Abläufe, sondern verändern auch Komponenten der Zellstruktur, so sollte eine Feinstrukturanalyse von Zellen dieser Stadien unterschiedliche Aspekte aufzeigen. Um die möglichen feinstrukturellen Veränderungen sichtbar zu machen, wurde die Kultur nach 72-stündiger Einwirkung von 250 ug/ml Rifampicin elektronenmikroskopisch untersucht. Ein Ausschnitt einer Zelle aus dieser Kultur ist in Abb.26 wiedergegeben.

Qualität und Verlauf der Thylakoide in Abb.26 entsprechen Bildern, wie sie nach Regeneration mit Chloramphenicol oder Spectinomycin (Abb 20 und 21) vorgestellt wurden. Wies aber nach Behandlung der regenerierenden Kulturen mit Inhibitoren der plastidären Translation das randständige Cytoplasma reichlich Ribosomen auf, so ist in Abb.26 deren Anzahl nach Einsatz von 250 ug/ml Rifampicin deutlich reduziert. Diese Kontrastarmut des cytoplasmatischen Randbelages konnte regelmäßig beobachtet werden.
Solche gravierenden Effekte auf das proteinbildende System des Cyto-

plasmas machen die beobachtete Unterdrückung der Chlorophyll- und Biliproteidakkumulation bei 250 ug/ml verständlich.
Bei der gleichen Inhibitorkonzentration sind die Regeneration der Photosynthesekapazität (Fig.11) und der Hill-Reaktion (Fig.12) massiv betroffen. Auch die mitochondriale Atmung erfährt eine starke Absenkung gegenüber der Kontrolle (Fig.13).

Der hier beschriebene starke unphysiologische Angriff auf Komponenten der Zelle verlangt eine zusätzliche Absicherung dahingehend, daß beim Einsatz niedriger Dosen von Rifampicin im Rotalgensystem keine feinstrukturell sichtbaren Schädigungen im obigen Sinn vorliegen. Da Kontrollen dieser Art für Rotalgen gar nicht und für Grünalgen auch nur vereinzelt vorliegen, gewinnen solche grundsätzlichen Studien an Bedeutung. Denn nur begleitende feinstrukturelle Analysen von Zellzuständen lassen eine gesicherte Interpretation der Ergebnisse von Antibiotika-Experimenten in vivo zu.
Da eine Absicherung der Ergebnisse gerade für den Grenzbereich der Rifampicin-Wirkung bei 5 ug/ml von Interesse ist, wurden Kulturen nach Behandlung mit 5 ug/ml - und 1 ug/ml Rifampicin für die elektronenmikroskopische Auswertung aufgearbeitet.

Zum Vergleich der Gesamt-Zellorganisation sind in Abb. 27 u. 28 zwei Zellen in Übersicht nach Einwirkung von Rifampicin in der oben angegebenen Konzentration größengleich gegenübergestellt. Augenfällig ist die in beiden Fällen gleichermaßen erfolgte flächenmäßige Regeneration des Anteils der Plastide. Auch der Zellkern zeigt eine Ausdehnung und Strukturerhaltung wie nach normaler 72-stündiger Regeneration. Die Abnahme von Vakuolen des Zellbinnenraumes und der Abbau der Florideenstärke sind ebenfalls ähnlich den Verhältnissen in der Kontrolle. Wie der durch starke Elektronenstreuung hervorgerufene Kontrast im randständigen Cytoplasma beider Zellen andeutet, darf auch ein normaler Gehalt an cytoplasmatischen Ribosomen als gesichert angesehen werden. Denn der Anteil der Ribosomen im Cytoplasma stellt die Hauptkomponente der korpuskulären Partikel.

Die hier verwendeten niedrigen Rifampicin-Konzentrationen führen also zu keinen feinstrukturell sichtbaren Veränderungen im Cytoplasma, so daß dort stärkere Nebeneffekte ausgeschlossen werden können.

Betrachtet man aber die relativen Kontrastunterschiede der Plastidenmatrix gegenüber dem umgebenden Cytoplasma, so fallen in den beiden Abbildungen deutliche Unterschiede ins Auge . Während nach Behandlung der Kultur mit 1 ug/ml Rifampicin (Abb.28) die Kontraste als nahezu gleichwertig erscheinen, zeichnet sich der Matrixraum der Plastidenlappen der Zelle nach Einwirkung von 5ug/ml Rifampicin durch deutlich erhöhte Elektronentransparenz gegenüber dem Cytoplasma aus (Abb.27). Die daraus resultierende "Aufhellung" des Anteils der Plastide gegenüber dem umgebenden Medium trifft alle Plastidenteile gleich.

Stärker vergrößerte Ausschnitte der Plastide nach Einwirkung von 5 ug/ml und 1 ug/ml Rifampicin sind in den Abb. 29 u.30 zu sehen. Sie verdeutlichen die Unterschiede der Elektronendichte im Matrixanteil der Plastide und lassen Unterschiede in der Zahl der plastidären Ribosomen erkennen.
Während also bei Behandlung der nach N-Mangel regenerierenden Kulturen mit geringen Dosen an Rifampicin eine Anhäufung von cytoplasmatischen Ribosomen nicht verhindert wird und auch andere Komponenten außerhalb des Chloroplasten keiner Schädigung unterliegen, kommt es bei Applikation einer hinreichenden Antibiotikamenge zu einer Verhinderung des Aufbaus neuer plastidärer Ribosomen.

Diese am Rotalgensystem gemachten Beobachtungen stimmen mit Ergebnissen von Untersuchungen an Grünalgen überein. Vereinzelt vorliegende Studien zur Feinstrukturänderung von Zellkomponenten bei Antibiotika-Einsatz in Grünalgen beschreiben eine Wirkung von Rifampicin auf die Ribosomen-Formation. So konnte keine Ribosomenbildung in Chlamydomonas beobachtet werden, wenn Zellen der Mutante ac-20 von mixotropher in phototrophe Kultur überführt wurden (Goodenough u. Levine, 1971). Auch der Wildstamm zeigte die gleiche Abhängigkeit (Goodenough, 1971). Ebenso erwies sich der Einsatz von 100 ug/ml Rifampicin in Chlorella als geeignet, die Ribosomenbildung der Plastide zu blockieren (Galling, Salzmann u. Spieß, 1973).

Vergleicht man die an Grünalgen gewonnenen Ergebnisse mit den obigen Befunden an Rhodella, so kann auch für die Rotalgen die Lokalisation der Information für plastidäre ribosomale Komponenten in der Chloroplasten-DNA gefordert werden.

Geht man aufgrund der Feinstrukturanalysen nach Rifampicin-Einwirkung davon aus, daß in Rhodella bei Blockierung der Transscription in der Plastide keine neuen, kompletten Plastidenribosomen aufgebaut werden können, ist die Interpretation der pigmentanalytischen Daten erschwert. Da aus den Versuchen mit Inhibitoren der plastidären Proteinsynthese zu schließen war, daß deren Produkte für die Pigmentanreicherung unentbehrlich sind (Fig. 10;15;16), kann der Einwand erhoben werden, daß die Inhibierung der Pigmentregeneration bei Einsatz von Rifampicin nur dem Nebeneffekt der Verhinderung der Bildung neuer Ribosomen zuzuschreiben ist.
Die mit Rifampicin gewonnenen Ergebnisse bedürfen daher einer eingehenden Diskussion (siehe 4.).

Bei niedrigen Konzentrationen an Rifampicin wird zusätzlich ein Effekt auf das Thylakoidsystem beobachtet, der dem mit Lincomycin in 3.8.4. beschriebenen sehr ähnlich ist. Die hier erzielten typischen feinstrukturellen Veränderungen sind in den Abbildungen31-33 wiedergegeben. Entsprechend der Abbildung 24a zeigt die Abb. 31 zusammengelagerte Thylakoide, die im Zentrum des Plastidenteils lokalisiert sind. Diese zeigen noch eine hohe Integrität durch scharfe Begrenzungen , wobei der verwaschene Aspekt der einen Hälfte wohl durch einen Schrägschnitt durch die Membranen zustande kommt.
Andere Verhältnisse können in den drei unterschiedlichen Ausschnitten der Abb. 32 a-c erkannt werden. Da in der kreisförmigen hellen Lage der stark elektronenstreuenden Kompaktstruktur der Abb. 32a membranöse Elemente nachweisbar bleiben, die übrige Masse aber schollenförmig aufgelöst erscheint, ist dieses Stadium klar von dem in Abb.31 zu unterscheiden.
Die Veränderung der Membrandarstellung scheint dabei auf Destruktionsprozesse hinzudeuten.
Dabei werden verschiedene Portionen des Membranmaterials nicht alle zur gleichen Zeit angegriffen, vielmehr können unterschiedliche Erhaltungszustände in einem Plastidenteil nebeneinander beobachtet werden (Abb.32c). Diese reichen von Beginn der Membranzusammenlagerung über die bereits erfolgte bis hin zur feinstrukturell nicht näher charakterisierbaren Aufgabe der Individualität der Einzelmembran.
Die Membranportionen werden ineinandergeschoben und können dann oft

ineinandergeschachtelte tonnenförmige Strukturen ausbilden (Abb.32a). Dabei sind verschiedene Übergänge möglich (Abb.32b u. c).
Wird bei der zufälligen Schnittführung durch die Zelle der Schnitt durch einen Bereich gelegt, der bereits frei von Thylakoiden ist, so wird der Aspekt der Abb.33 sichtbar. Der stets von zwei Hüllmembranen umzogene Bereich zeigt dann nur noch granuläre Komponenten, die gleichmäßig in der Fläche verteilt die Plastidenmatrix ausfüllen.

In der Literatur wurden durch Rifampicin-Einwirkung hervorgerufene Effekte solcher Art noch nicht beschrieben. Eine gewisse Gemeinsamkeit mit Befunden an Grünalgen ergibt sich insofern, als für Chlamydomonas desorganisierte Membranen in Form von Clustern kleiner Vesikel beschrieben wurden (Surzycki et al., 1970; Goodenough, 1971), was gleichfalls die Bedeutung der genetischen Information des Chloroplasten für die Membrankonstruktion und -organisation belegt.

In Rhodella scheint der Informationsgehalt der Plastiden-DNA größer zu sein, als sich nach Ausschalten der Plastidenribosomen feinstrukturell sichtbar als Ergebnis der Umsetzung dieser Information nachweisen läßt. Denn die oben beschriebene Destruktion des Thylakoidsystems ist nicht als typischer Effekt nach Chloramphenicolbehandlung zu erkennen. Dieses Ergebnis kann dafür sprechen, daß gewisse m-RNA's aus der Plastide an cytoplasmatischen Ribosomen translatiert werden. Zu fordern ist dies zumindest für solche Proteine, die für die Erhaltung der strukturellen Integrität der Thylakoidmembranen verantwortlich sind.

3.12. Untersuchungen zur Regeneration von Rhodella nach N-Mangel bei heterotropher Anzucht in Dunkelheit.

Für die Frage der Regulation der Biliproteidbildung sind Untersuchungen zur Abhängigkeit von bestimmten Wellenlängen der sichtbaren Strahlung bedeutsam geworden. So konnte in einigen biliproteidführenden Algen eine Abhängigkeit der quantitativen Biliproteid-Zusammensetzung von der Qualität des eingestrahlten Lichts festgestellt werden. Diese sogenannte chromatische Adaptation ist von bedeutendem Interesse für Fragen der Photo-Differenzierung. Am besten untersucht ist die chromatische Adaptation an Blaualgen wie Tolypothrix tenuis und Fremyella diplosiphon, eine Zusammenfassung der bekannten Daten schrieb Bogorad 1975 (b).

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Untersuchung zur Differenzierung der Plastide nach N-Mangel liegt es nach Bearbeitung der Bedeutung der beiden Proteinsyntheseorte nahe zu fragen, ob der Faktor Licht für Thylakoidformation und Pigmentbiosynthese grundsätzlich überhaupt notwendig ist. Denn nach bisher vorliegenden Untersuchungen sind die Ergebnisse nicht einheitlich. Während z.B. in höheren Pflanzen zur Reduktion von Protochlorophyllid zum Chlorophyllid Licht unerläßlich ist, sind Vertreter von Bakterien, Algen und Moosen sowie von Farnen und Gymnospermen in der Lage, diesen Prozeß auch bei Dunkelheit zu ermöglichen. Auch für die Biosynthese der Phycobiliproteide liegen keine einheitlichen Ergebnisse vor.
So ist die trichale Blaualge Tolypothrix tenuis in der Lage, nach Überführung in Dunkelheit unter bestimmten Bedingungen komplette Phycobiliproteide zu synthetisieren (Hattori u. Fujita, 1959). Bei diesen Experimenten wurden zur Reduktion des Pigmentgehaltes die Algen in nitratfreiem Medium hohen Lichtintensitäten ausgesetzt. Nach Rücküberführung in Vollnährmedium startete die Biliproteidsynthese nach 5 Stunden (Hattori u. Fujita, 1959; Fujita u. Hattori, 1960). Geringe Bildungsraten wurden erzielt, wenn die Vorinkubation in nitratfreiem Medium fehlt. Wurden die Zellen jedoch in Dunkelheit auch ohne diese Vorbehandlung mit ALA gefüttert, so wurde ebenfalls eine deutliche Synthese beobachtet.

Andere Ergebnisse wurden mit der einzelligen acidophilen Rotalge Cyanidium caldarium erzielt. Diese kann mit Glucose in Dunkelheit

gezogen werden, eine Biliproteidsynthese ist aber dann nicht mehr nachweisbar. Die Produktion von kompletten Biliproteiden bedarf also kontinuierlicher Belichtung. Auch die Zugabe von ALA brachte hier keine Veränderung. Jedoch wurde bei dieser Behandlung die Synthese von Uroporphyrin III, Coproporphyrin III und Protoporphyrin ermöglicht; auch große Mengen von Phycocyanobilin-630 wurden frei, so daß das Medium sichtbar blau gefärbt war (Troxler u. Bogorad, 1966; Troxler u. Brown, 1970).
Die unterschiedliche Wirkung der ALA-Applikation in Kulturen von Tolypothrix und Cyanidium ist also deutlich. Während die Rotalge nur zur Bildung von Chromophoren in der Lage ist, synthetisiert die Blaualge komplette Phycobiliproteide.
Untersuchungen an der bangialen einzelligen Rotalge Rhodella violacea in Bezug auf diese Punkte sollten daher dazu beitragen, die offene Frage zu überprüfen, ob die unterschiedliche Befähigung zur Biliproteidsynthese in Abhängigkeit von Licht die beiden systematischen Gruppen voneinander trennt.

Hierzu wurden die Zellen der N-Mangelkultur in Vollnährmedium überführt und unter völligem Ausschluß von Licht 3 Tage kultiviert. Als frei verfügbare Kohlenstoffquelle wurde sowohl Glucose wie auch Glycin in der Konzentration von 10 g/l dem Kulturmedium zugesetzt. Die Begasung der Kultur erfolgte dabei sowohl mit CO_2 in Luft wie bei normaler phototropher Anzucht, als auch mit CO_2-freier Atmosphäre. Während die Begasung mit kohlendioxid-haltiger Luft keinen Vorteil bei Anzucht in Dunkelheit erbrachte, erwies sich Glucose gegenüber Glycin als besser verwertbare Kohlenstoffquelle. Die untersuchten Synthesen während der Regeneration liegen bei Zugabe von Glucose ca. doppelt so hoch wie nach Applikation von Glycin. Alle folgenden Ergebnisse beziehen sich daher auf Anzuchten mit Glucose.

3.12.1. Pigmentanalytische- und funktionelle Daten zur Regeneration der Zellen.

Bei heterotropher Kultur ergibt sich der in Fig.23 wiedergegebene

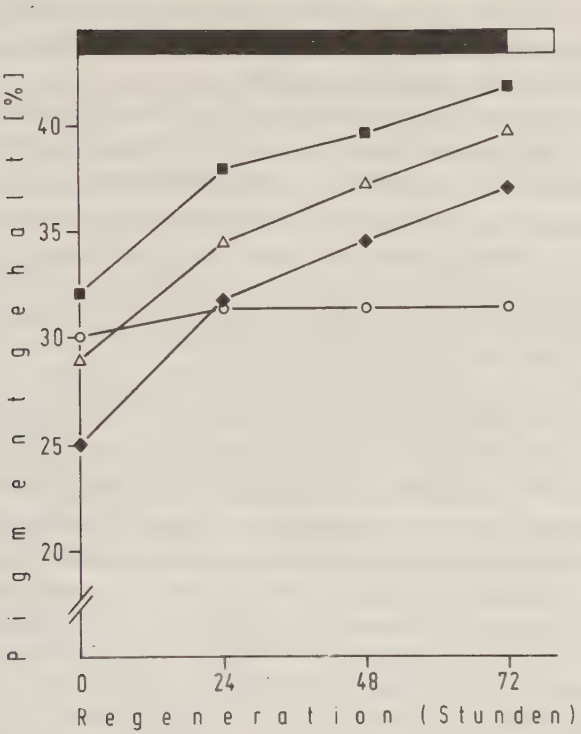


Fig.23 Pigmentsynthese nach N-Mangel bei heterotropher Anzucht in Dunkelheit. Als Kohlenstoffquelle wurde Glucose in der Konzentration 10 g/l eingesetzt. Symbole wie in Fig.4.

Verlauf der Pigmentregeneration . Die Meßpunkte stellen Mittelwerte aus mehreren Messungen dar. Auffällig ist die unter den vorgegebenen Bedingungen unterschiedliche Syntheserate von Chlorophyll a und Biliproteiden. Nach einem noch geringfügigen Anstieg des Gehaltes an Chlorophyll während der ersten 24 Stunden ist dessen Synthese im weiteren Verlauf der Regeneration völlig blockiert.
Demgegenüber steigt der Gehalt an Biliproteiden in der Kultur innerhalb 24 Stunden überproportional an und erweist sich auch nach längerer Anzucht in Dunkelheit weiterhin zunahmefähig. Der Kurvenverlauf flacht

dabei ab, zeigt aber bis zum 3.Tage eine geradlinige d.h. gleichmäßige Synthese an, wobei die drei Biliproteidkomponenten im gleichen prozentualen Rahmen regeneriert werden.
Der Gehalt an Phycoerythrin nimmt dabei von 25% auf 37% der Normalkultur zu, der Phycocyanin-Anteil steigt von 29% auf knapp 40% und Allophycocyanin wird von 32% auf ca. 42% regeneriert.

Gemeinsam mit den Verhältnissen in phototropher Kultur wird also während 72-stündiger Anzucht in Dunkelheit eine klare Steigerung des Biliproteidgehaltes der Kultur registriert. Die prozentuale Zunahme pendelt sich aber deutlich reduziert bei im Mittel ca. 1/3 der Bildungsraten der photo-autotrophen Kultur ein.
In einer Phase , in der Chlorophyll nicht mehr gebildet werden kann, nimmt der Biliproteidgehalt weiterhin deutlich zu. Dies zeigt an, daß die Phycobilin-Biosynthese in Rhodella unabhängig ist vom Faktor Licht, wie es auch für Tolypothrix sowie Cyanidium beschrieben wurde.
Im Unterschied aber zu den Befunden an der Rotalge Cyanidium wird in Rhodella zusätzlich zur Phycobilin-Synthese auch die Bildung der entsprechenden Apoproteine registrierbar, wie aus der spektralphotometrischen Analyse der Lage der Absorptionsmaxima zu entnehmen ist. In Rhodella gelten also ähnliche Verhältnisse, wie sie für Blaualgen bekannt wurden (Fujita u. Hattori, 1960; Ohki u. Katoh, 1976).
Im Gegensatz aber zu den Befunden an den anderen Organismen führt eine Applikation von ALA in z.t. relativ hohen Dosen von 6×10^{-3} Mol/l zu keiner Steigerung der Pigmentsynthesen in Rhodella. Auch die Chromophorenbildung selbst wird nicht positiv beeinflußt. Da wie schon vorne erwähnt davon ausgegangen werden kann, daß ALA als Ausgangssubstrat zur Phycobilin-Synthese anzusehen ist, wird die in Rhodella zu beobachtende Unverwertbarkeit von mit dem Nährmedium verabreichten ALA darin gesehen, daß es in der vorliegenden Form nicht in die Zellen aufgenommen werden kann.

Vergleichende Sauerstoffmessungen während der Regeneration der Kultur unter heterotrophen Bedingungen zeigen (nicht dargestellt), daß die Photosynthesekapazität der Zellen nach 72 Stunden gegenüber dem N-Mangelzustand ca. verdoppelt wird. Auch die Regeneration der Photosystem II-Reaktion erfolgt prozentual in etwa im gleichen Rahmen.
Eine solche Steigerung der photosynthetischen Sauerstoffentwicklung

erfordert aber eine Reorganisation des Thylakoidsystems (siehe 3.4.), so daß aufgrund dieser Messungen eine Hemmung der Membrankomplettierung als ausgeschlossen betrachtet wird. Die Steigerung speziell der Photosystem II-Reaktion bedarf im Normalfall zusätzlich der Neusynthese von Biliproteiden, die nur in enger Assoziation mit den photosynthetisch aktiven Thylakoiden die absorbierte Lichtenergie auf das Reaktionszentrum der Photosynthese zu übertragen in der Lage sind.

Nach Untersuchungen von Ohki u. Katoh (1976) an Anabaena variabilis jedoch wurde gefunden, daß in Dunkelheit synthetisiertes Phycocyanin nicht in der Lage war, die absorbierte Strahlungsenergie auf Chlorophyll zu übertragen, obwohl das Photosystem II als funktionell intakt anzusehen war. Dieser Befund wurde damit erklärt, daß möglicherweise die neu gebildeten Phycobilisomen gegenüber den im Licht aggregierten in nicht ausreichend fester Bindung an den Photosyntheselamellen ansitzen.

Um diese Frage der Fähigkeit der Energieübertragung von Phycobilisomen auf Chlorophyll a im Rotalgensystem von Rhodella zu überprüfen, bot sich hier eine Untersuchung mit Hilfe der Fluoreszenz-Spektroskopie an.

So sind neben den Daten zur Charakterisierung der Fluoreszenz-Emission der bei Rhodella vorliegenden Biliproteid-Komponenten (Koller u. Wehrmeyer, 1974) auch die Fluoreszenzeigenschaften isolierter, intakter Phycobilisomen bekannt (Koller, Wehrmeyer u. Schneider, 1977; Mörschel et al., 1977).
Sind die während 72-stündiger Regeneration in Dunkelheit synthetisierten Biliproteide in der Lage, funktionsfähige Phycobilisomen aufzubauen, so sollte sich dies in einer Steigerung der Chlorophyll-Emission nach Anregung im Biliproteidbereich bemerkbar machen.

In Fig. 24 sind die nach Anregung im Maximum der Phycoerythrin-Absorption bei 545 nm (siehe Fig.1) resultierenden Fluoreszenz-Emissionsspektren ganzer Zellen der N-Mangelkultur sowie der Kulturen nach 72-stündiger Regeneration mit und ohne Licht einander gegenübergestellt. Um quantitative Aussagen über die Höhe der Fluoreszenzemission machen zu können, wurden die Spektren auf die Empfindlichkeit des Photomultipliers per Hand korrigiert und anschließend

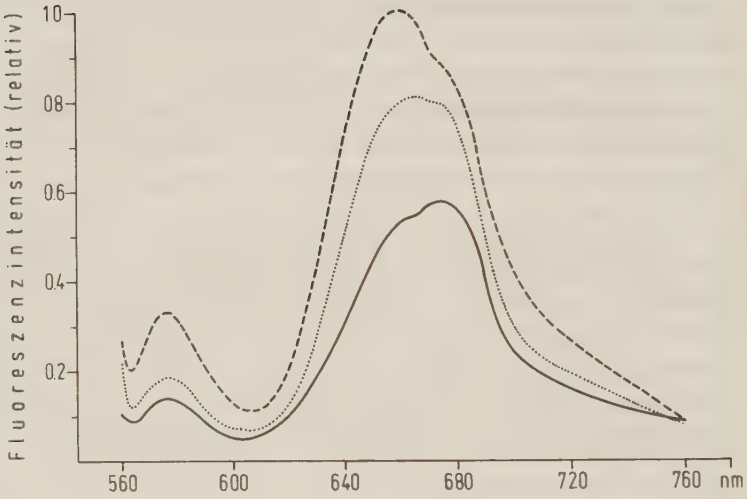


Fig.24 Fluoreszenz-Emissionsspektren ganzer Zellen nach Anregung im Maximum der Phycoerythrin-Absorption bei 545 nm. Die Spektren wurden per Hand korrigiert und anschließend normiert.
N-Mangelkultur (——). 72 Stunden Regeneration in heterotropher Kultur (.....). 72 Stunden Regeneration in photoautotropher Kultur (-----).

auf den Maximalwert der Emission normiert.
Wie in Fig.24 ersichtlich, erfolgt eine Steigerung der Fluoreszenz-Emission gegenüber der N-Mangelkultur sowohl nach autotropher- wie heterotropher Anzucht, wobei sich die Quantität der Fluoreszenz-Emission der ersteren als am größten erweist. Ein Vergleich mit den Charakteristika isolierter Pigmente (Koller u. Wehrmeyer, 1975) zeigt, daß das erste Maximum der Fluoreszenz-Emission bei 576 nm der des Phycoerythrins zugeordnet werden kann, das bei 575 nm (B-PE I) und 578 nm (B-PE II) fluoresziert.
Das zweite Hauptmaximum nach Regeneration in phototropher- und heterotropher Kultur liegt bei 662- bzw. 665 nm, je nachdem es durch

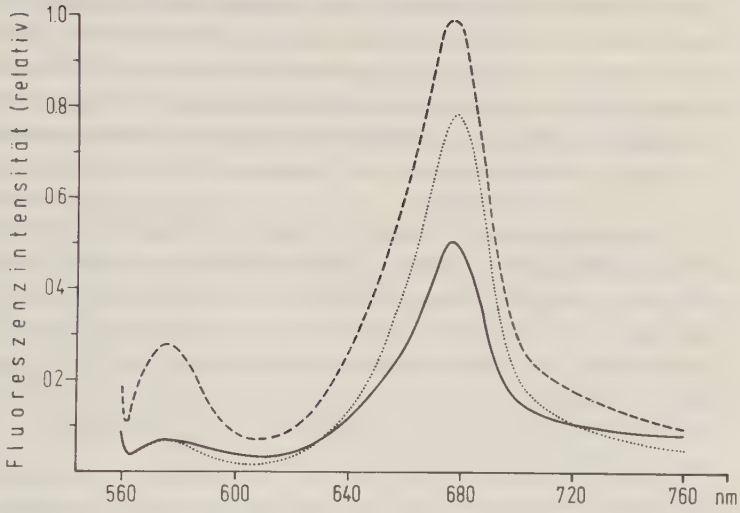


Fig.25 Fluoreszenz-Emissionsspektren ganzer Zellen nach Anregung im Maximum der Phycoerythrin-Absorption bei 545 nm. Vor der Messung 10 Minuten Einwirkung von 2×10^{-4} M DCMU. Sonst wie in Fig. 24.

längerwellige Fluoreszenz beeinträchtigt wird. Wie Koller, Wehrmeyer u, Schneider (1977) zeigten, liegt das Emissionsmaximum isolierter Phycobilisomen bei 665 ± 2 nm. Aus diesem Grunde kann das angesprochene Maximum der Emission in ganzen Zellen ebenfalls dem der Fluoreszenz von Phycobilisomen zugeschrieben werden.
In den drei Kulturen unterschiedlich stark wird ein weiteres Nebenmaximum der Fuoreszenz-Emission deutlich. Dieses bildet in der N-Mangelkultur das zweite Maximum des Spektrums, so daß die Phycobilisomen-Emission nur noch als Schulter um 662 nm ausgeprägt wird. Dieses Maximum liegt bei 676 nm. In den regenerierten Kulturen wird das Spektrum durch unterschiedlich starke relative Emission in diesem Bereich verschieden stark modifiziert. Stets aber fällt dieser Wellenlängen-

bereich zumindest durch Ausprägung einer Schulter auf. Da wie schon erwähnt die Phycobilisomen die absorbierte Lichtenergie von Phycoerythrin über Phycocyanin und Allophycocyanin auf das Reaktionszentrum der Photosynthese übertragen, muß die Fluoreszenz-Emission bei 676 nm der von Chlorophyll zugeschrieben werden. Daß Chlorophyll a abhängig vom Suspensionsmedium und anderen Faktoren in diesem Bereich fluoresziert, ist seit langem bekannt.

Für die Fragestellung von Bedeutung ist der Befund, daß nach Regeneration der Zellen in heterotropher Kultur eine Steigerung der Fluoreszenz-Emission sowohl im Bereich der Emission der Phycobilisomen als auch in dem des Chlorophylls demonstriert werden kann. Nachteilig für eine quantitative Angabe der Steigerung der Emission durch Chlorophyll jedoch erweist sich die parallel dazu stärkere Zunahme der Phycobilisomen-Emission, die einen Anstieg im Chlorophyll-Bereich vortäuschen könnte.

Aus diesem Grunde wurde die Fluoreszenzmessung durch Applikation eines Wirkstoffes modifiziert, der auf die Elektronentransportkette einzuwirken vermag. Grundgedanke dabei war, daß eine Blockierung des photosynthetischen Elektronentransportes hinter Photosystem II zu einer Steigerung der Fluoreszenz von Chlorophyll führen sollte. Bei den vorliegenden Untersuchungen wurde daher als Hemmstoff der Elektronentransportkette DCMU eingesetzt, von dem angenommen wird, daß es den Elektronenfluß zwischen dem primären Akzeptor Q und dem Plastochinonpool unterbricht (Witt, 1971; Döring, 1975). Zum Einsatz kam eine Konzentration von 2×10^{-4} M.

Die Ergebnisse dieser Messungen werden in Fig.25 vorgestellt. Aus dieser Figur nicht zu ersehen wegen der erneuten Normierung auf den höchsten Wert ist die Steigerung der Fluoreszenz-Emission von Chlorophyll nach Einwirkung von DCMU auf mehr als das Doppelte der unbehandelten Kultur. Aus diesem Grunde macht sich die Phycobilisomen-Fluoreszenz um 665 nm nicht einmal mehr als Schulter bemerkbar (Fig.25). Das erste Maximum der Fluoreszenz , hervorgerufen durch die Phycoerythrin-Emission, kann dabei in der Lage unverändert bei 576 nm beobachtet werden.

Die so erhaltenen Spektren sind daher hervorragend geeignet, die Frage nach der möglichen Steigerung der Chlorophyll-Emission nach heterotropher Anzucht zu beantworten.
Wie die Lage des Maximums der Chlorophyll-Emission nach Regeneration in Dunkelheit nach 72 Stunden zeigt, liegt es deutlich gegenüber der des N-Mangelzustands in der Höhe verschoben, wobei der Unterschied mehr als die Hälfte der Emission nach N-Mangel ausmacht.
Für Rhodella kann also klar belegt werden, daß in Dunkelheit nicht nur eine Biliproteidsynthese nachweisbar ist, sondern das neugebildete Pigmentmaterial auch zum Energietransfer befähigt ist.Daher kann für den Prozeß des self-assembly in vivo der Faktor Licht nicht als ausschlaggebend angesehen werden. Gleichzeitig sprechen die Befunde für die Ausbildung kompakter, funktionsfähiger Phycobilisomen.

Die nach Regeneration im Licht zu beobachtende weitere Steigerung des Energietransfers von Phycobilisomen auf das Reaktionszentrum der Photosynthese kann sicherlich der mengenmäßig stärkeren Biliproteidsynthese zugeschrieben werden.

Wenn auch die Bildungsrate für Biliproteide nach Anzucht der Zellen in Dunkelheit deutlich gegenüber der im Licht zurückbleibt, so sollte doch eine Feinstrukturanalyse von Plastiden aus dieser Kultur den nach obigen Befunden zu fordernden Phycobilisomennachweis ermöglichen. Gleichzeitig kann dadurch die im Vergleich zu der Kontrolle vorliegende Phycobilisomenanordnung überprüft werden.

3.12.2. Elektronenmikroskopische Befunde zur Feinstruktur von Rhodella nach 72-stündiger Regeneration.

Das in Abb.34 wiedergegebene Übersichtsbild einer Zelle nach 72-stündiger Regeneration in heterotropher Kultur demonstriert Verhältnisse, wie sie auch nach Regeneration im Licht gegeben sind (nicht gezeigt). Die Gemeinsamkeiten betreffen alle Komponenten (siehe 3.4.1.). Auf die volle flächenmäßige Regeneration der Plastide sowie die normale Anordnung der Thylakoidmembranen soll hier besonders hingewiesen werden.

Die plastideneigenen Verhältnisse zeigt Abb. 35. Die mit der Phycobilisomenfeinstruktur und der Phycobilisomenanordnung verbundenen Fragen können durch Auswertung der mit den zentralen inneren Thylakoidlagen assoziierten Biliproteidaggregate beantwortet werden.
Nur selten gelingt es wie hier, Plastidenbereiche zu schneiden, die auf engstem Raum alle drei Aspekte der Phycobilisomenfeinstruktur so deutlich zeigen. Dies um so mehr, als unter den hier vorliegenden Bedingungen in einer Vielzahl von angeschnittenen Plastidenteilen nur hin und wieder einige Phycobilisomen auf komplettierten Thylakoiden deutlich zu beobachten sind.
Wie die Flächenansichten der Phycobilisomen zeigen, sitzen diese mit ihrer verbreiterten Basis ohne Zwischenraum den Thylakoiden auf, wie für eine Energieübertragung auf das in der Membran integrierte Chlorophyll nach obigen Befunden zu fordern war.
Der klare Kontakt mit der Membran wird auch in den Profilansichten deutlich, die gleichzeitig die Existenz von in der Fläche gestaffelten Phycobilisomen belegen.
Die Oberflächenansichten demonstrieren ebenso die geldrollenartige Aggregation aus anderer Perspektive.
Die Auswertung der Dimensionen der hier gezeigten Phycobilisomen ergibt keinen signifikanten Unterschied gegenüber der Kontrolle.

Mit der Regeneration der Zellen von Rhodella in heterotropher Kultur ist also sowohl der Aufbau kompletter, funktionsfähiger Phycobilisomen, als auch die gleiche wie im Normalfall zu beobachtende sekundäre Musterbildung auf den Photosynthesemembranen verbunden. Unterschiede gegenüber den Verhältnissen in der autotrophen Kultur sind also nur quantitativer Natur.

4. DISKUSSION

Die verschiedenen, mit Stickstoffmangel verbundenen biochemischen Veränderungen innerhalb von Zellen sind überwiegend durch Untersuchungen an Grünalgen bekannt geworden.
Für die Rotalgen hingegen sind Angaben zum N-Haushalt spärlich geblieben. Diese beziehen sich zunächst auf die nutzbaren N-Quellen (Birdsey u. Lynch, 1962; Fries, 1963) oder unterstreichen die Unentbehrlichkeit von Stickstoff für die Chlorophyll- und Biliproteidbildung (Fujita u. Hattori, 1960; Troxler u. Bogorad, 1966; Guerin-Dumartrait, Leclerc u. Hoarau, 1973; Lau, Mac Kenzie u. Doolittle, 1977).

Eine Feinstrukturanalyse von einzelligen Rotalgen unter N-Mangelbedingungen lieferten Wehrmeyer u. Schneider (1975). In elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Rhodella violacea (Abb.6) läßt sich eine mit der Stickstoffmangelsituation verbundene massive Speicherung von extraplastidärer Stärke aufzeigen. Einen Anstieg des Gehaltes an Kohlenhydrat bei N-Mangel stellten auch Allen u. Smith (1969) bei Anacystis nidulans fest. War schon unter Normalbedingungen bei der photosynthetischen $^{14}CO_2$-Fixierung durch Rotalgen der größte Teil des radioaktiv markierten Kohlenstoffs im Kohlenhydrat und nur ein geringer Teil in Aminosäuren nachweisbar (Majak, Craigie u. Mc Lachlan, 1966), so wird verständlich, daß bei fehlenden N-Reserven unter den N-Mangelbedingungen der Kohlenhydratanteil noch erheblich ansteigt.
Während weiterhin bei Grünalgen eine durch N-Mangel bedingte verstärkte Synthese von Sekundärcarotinoiden (Dersch,1960; Kessler u. Czygan, 1967; Czygan, 1968; Weber, 1975) nachhaltig belegt wurde, nimmt bei Rhodella der Gesamtcarotinoidgehalt stark ab (3.3.).
In Übereinstimmung mit Befunden an Grünalgen (Aach, 1953;Mayer u. Czygan, 1969; Weber, 1975) ist in Rhodella eine starke Abnahme von Chlorophyll unter N-Mangelbedingungen nachweisbar gewesen. Diese machte nach nur 6-tägigem Stickstoffentzug bereits 70% aus (3.3.).
Da auch ein völliger Verlust an Chlorophyll nicht die elektronenmikroskopisch faßbare Struktur der Thylakoidmembranen aufhebt (Gergis, 1969; Mayer u. Czygan, 1969), sind die in Rhodella festgestellten Defekte im

Thylakoidsystem der Plastide wohl weniger auf Schwund an Chlorophyll zurückzuführen, sondern dem veränderten Protein/Lipid-Verhältnis nach 6-tägigem N-Mangel zuzurechnen.
Ein mit dem N-Mangel einhergehender Verlust von Biliproteiden, verbunden mit einem Farbwechsel der Kultur, wurde bereits für höhere Rotalgen von Haxo u. Strout (1950), für Porphyridium cruentum von Gantt u. Conti (1966 a) und Guerin-Dumartrait, Leclerc u. Hoarau (1973), sowie für Cyanidium caldarium von Troxler u. Bogorad (1966) beschrieben. Cyanophyceen unter N-Mangelbedingungen untersuchten Allen u. Smith (1969) und stellten auf Grund spektralphotometrischer Messungen den raschen quantitativen Abbau von Phycocyanin fest. Van Gorkom u. Donze (1971) bestätigten diesen Befund und schlossen daraus auf eine mögliche Funktion der Biliproteide als leicht verfügbare Stickstoffreserve der Zelle. An Hand der vorgestellten Bilder 6-tägiger N-Mangelstadien läßt sich hingegen klar zeigen, daß der N-Mangel Phycobilisomen und Thylakoide zwar gleichermaßen trifft, wie die Abbildungen 7 u. 8 belegen, die Phycobilisomen aber nicht bevorzugt und quantitativ zugunsten einer generellen Strukturerhaltung der Thylakoide abgebaut werden.

Das rasche Regenerationsvermögen von N-Mangelzellen nach erneuter Zugabe von Stickstoff ist für Grünalgen und Cyanophyceen nachhaltig belegt worden.
Über die mit der Regeneration verbundenen Veränderungen im Feinbau der Zelle und speziell des Photosyntheseapparates liegen hingegen kaum Untersuchungen vor. Nur die chlorococcalen Grünalgen Chlorella fusca und Ankistrodesmus braunii wurden von Mayer u. Czygan (1969) bearbeitet. Vergleicht man die dort ermittelten Ergebnisse mit den an der einzelligen Rotalge Rhodella violacea beobachteten Veränderungen, so ergeben sich erhebliche Unterschiede. Während bei Chlorella der N-Mangel nur mit einer Reduktion der Zahl und Ausdehnung der Thylakoide verbunden ist, ihr Aspekt in der Zelle aber sonst unverändert erscheint, treten bei Rhodella dagegen spezifische Defekte in der Feinstruktur der Thylakoide klar zutage. In gleicher Weise beschränkt sich die Regeneration bei Chlorella feinstrukturell gesehen auf eine quantitative Zunahme der Thylakoide nach Zahl und Ausdehnung, während sie in Rhodella in mehreren charakteristischen Schritten abläuft.

Diese beinhalten 1. die primäre Wiederherstellung distinkter Thylakoidmembranen (Abb.12) und darauf erfolgende Neuordnung der Thylakoide in äquidistanten Schichten (Abb.13) und 2. die Neubildung von Phycobilisomen und Anordnung an den Thylakoidoberflächen (Abb.14).

Dieser als Normalfall der Differenzierung angesehene Regenerationsprozeß ist durch den Einsatz von Inhibitoren der Translation und Transscription analysiert worden.
Wie die elektronenmikroskopischen Untersuchungen in 3.7.1 zur Wirkung von Cycloheximid auf die Wiederherstellung des Thylakoidsystems zeigen, läßt sich in Rhodella violacea feinstrukturell eine überragende Bedeutung der Cytoplasmaribosomen für die Formation eines normal organisierten Thylakoidsystems nachweisen. Dies steht in Einklang mit feinstrukturellen Untersuchungen an u.a. Chlamydomonas reinhardi y-1 (Hoober, Siekevitz u. Palade, 1969), die mit 1 ug/ml Cycloheximid eine Reduktion der Thylakoide parallel zum Chlorophyllgehalt beobachteten, während Goodenough u. Levine (1971) an Chlamydomonas ac-20 bei gleicher Cycloheximidkonzentration keine Effekte auf die Thylakoidregeneration registrierten.
In parallel durchgeführten biochemischen Untersuchungen zeigten Chua u. Gillham (1977) durch Markierung von Zellen mit ^{14}C-Acetat, daß von insgesamt 33 nachgewiesenen Thylakoidmembranpolypeptiden nur 9 an Chloroplastenribosomen synthetisiert wurden. Daß der überwiegende Teil der Membranproteide als Syntheseprodukt cytoplasmatischer Ribosomen angesehen werden kann, wurde auch für Chloroplastenthylakoide von Euglena (Vasconcelos, 1976) und Spinat (Bottomley, Spencer u. Whitfeld, 1974) sowie weiterer höherer Pflanzen bestätigt (Høyer-Hansen u. Simpson, 1977; Ellis, 1977).

Darüber hinaus ist die Pigmentbildung selbst von den Cytoplasmaribosomen abhängig, wie u.a. für die Ergrünung in Chlamydomonas reinhardi y-1 gezeigt werden konnte (Hoober, Siekevitz u. Palade, 1969; Eytan u. Ohad, 1970). Wie aus Versuchen mit Hemmstoffen der Translation hervorgeht, konnte die Synthese von ALA-Synthetase, ALA-Dehydrogenase, Porphobilinogenase u. Chlorophyllase nur mit Cycloheximid (Beisenherz u. Schneider, 1974), nicht aber mit Inhibitoren der Pro-

teinsynthese an plastidären Ribosomen gehemmt werden (Schneider u. Beisenherz, 1974).

Diese Ergebnisse machen die totale Blockierung der Chlorophyllsynthese nach N-Mangel auch in Rhodella nach Einwirkung von Cycloheximid verständlich.
Erstaunlich ist hingegen die völlige Blockierung der Biliproteidsynthese . Dies kann sowohl in der Hemmung der Phycobilinsynthese als auch in der von Apoprotein begründet liegen.
Eine Parallelität der Chlorophyll- und Phycobilinsynthese ist nach den Arbeiten von Troxler u. Bogorad (1970), sowie Troxler u. Brown (1970), Troxler (1972) und Troxler u. Dokos (1973) zu erwarten.
Wie die vorliegenden Untersuchungen nach sukzessivem Einsatz von Cycloheximid und Chloramphenicol nahelegen, muß auch die Apoproteinsynthese der Biliproteide der Leistung der cytoplasmatischen Ribosomen zugeordnet werden. Dadurch wird auch die vollständige Hemmung der Biliproteidbildung nach Blockierung der cytoplasmatischen Ribosomen erklärbar.

Im Gegensatz dazu erscheinen die plastidären Ribosomen für die Plastidendifferenzierung weniger bedeutsam. Feinstrukturell kommt es zu einer weitgehenden Regeneration der Plastide und des Thylakoidsystems. Es sollte dabei nicht übersehen werden, daß unter Lincomycineinwirkung regelmäßig durch lokale Thylakoiddegeneration konzentrische Membrananordnungen angetroffen wurden. Diese scheinen als irreversibel geschädigte Produkte später aus der Plastide eliminiert zu werden.
Die der Thylakoidregeneration vorausgehende Volumenzunahme der Plastide in Rhodella kann u.a. auf die Synthese löslicher Proteine zurückgeführt werden. Sie ist unter Chloramphenicoleinwirkung bei intakten Cytoplasmaribosomen beachtlich, in Cycloheximidgegenwart dagegen nur geringfügig erhöht (ca. 5%). Immerhin ist die Synthese löslicher Proteine als Leistung plastidärer Ribosomen für Euglena (Vasconcelos, 1976) sowie Höhere Pflanzen gezeigt worden (Bottomley, Spencer u. Whitfeld, 1974; Morgenthaler u. Morgenthaler, 1976; Ellis, 1977).
In Gegenwart von Hemmstoffen der plastidären Proteinbiosynthese wurden eine reduzierte Chlorophyll- und Biliproteidakkumulation beobachtet. Ob der limitierende Faktor dabei in einem Substrat- bzw. Enzymmangel

oder im Fehlen von Carrierproteinen zu suchen ist, soll Gegenstand der folgenden Diskussion sein.
Wie aus den Versuchen mit sukzessivem Inhibitoreinsatz in 3.10. beschrieben wurde, kann die Synthese der Apoproteine der Biliproteide am ehesten der Fraktion der Cytoplasmaribosomen zugesprochen werden. Voraussetzung für die Akkumulation der Biliproteide in Form von Phycobilisomen auf den Thylakoiden ist aber ihr Eintritt in die Plastide, wobei ihre Permeation über die begrenzenden Hüllmembranen der Plastide entscheidend ist. Für Erbsenchloroplasten konnte gezeigt werden, daß nach dem Verfahren von Mackender u. Leech (1970) isolierte Chloroplastenhüllmembranen zumindest 2 Polypeptide als Produkte plastidärer Proteinsynthese aufweisen (Joy u. Ellis, 1975). Auch für drei in den Chloroplastenhüllmembranen von Spinatchloroplasten vorkommende Polypeptide konnte die Synthese an Chloroplastenribosomen wahrscheinlich gemacht werden (Morgenthaler u. Morgenthaler, 1976). Möglicherweise üben bestimmte Produkte der Proteinsynthese in Chloroplasten Kontrollfunktionen für die Permeation von im Cytoplasma synthetisierten Proteinen in den Chloroplastenbinnenraum aus. Der Mechanismus ist bis heute unbekannt geblieben. Für den Eintritt der kleinen Untereinheit von Fraction I-Protein in die Plastide zur Komplettierung der plastidär gebildeten großen Untereinheit wurde die Modellvorstellung der Arbeitsgruppe um Blobel (s. Campbell u. Blobel, 1976) kürzlich herangezogen (Dobberstein, Blobel u. Chua, 1977). Danach wird von einem höhermolekularen "precursor" von 2o ooo Dalton eine kleinere Peptidkette von ca. 35oo Dalton als "Signalsequenz" für den Eintritt in die Plastide verantwortlich gemacht. Entsprechende Untersuchungen für Biliproteide stehen bis heute noch aus.

Wie die Untersuchungen zur Bedeutung der plastideneigenen DNA für die Thylakoidformation in 3.11. zeigen, werden die Membranen während der 72-stündigen Einwirkung von Rifampicin zum überwiegenden Teil regeneriert. Lokal aber können charakteristische Destruktionsprozesse im Thylakoidsystem beobachtet werden.
In der Literatur fehlen bislang Hinweise auf solche durch Rifampicineinwirkung hervorgerufene Effekte. So wurde für Chlorella bei Applikation von 100 ug/ml der Droge sogar eine normale Ausbildung von Thylakoidmembranen in granaähnlicher Anordnung beschrieben, (Galling, Salzmann

u. Spieß, 1973). Aus elektronenmikroskopischen Untersuchungen an Chloroplasten von Chlamydomonas dagegen sind desorganisierte Membranen in Form von Clustern kleiner Vesikel bekannt geworden (Surzycki et al., 1970; Goodenough, 1971), die eine gewisse Gemeinsamkeit mit den Befunden bei Rhodella aufweisen. Im Gegensatz zu Befunden an Grünalgen wird mit geringen Dosen an Rifampicin neben der Inhibierung der Biliproteidanreicherung auch ein deutlicher Effekt auf die Chlorophyllbiosynthese beobachtet (3.11.1.). Da das gleiche Ergebnis auch mit Inhibitoren der plastidären Proteinsynthese erzielt wurde, kann das fehlende bzw. die fehlenden Syntheseprodukte als in der Chloroplasten-DNA codiert angesehen werden. Ob diese Ergebnisse als speciesspezifisch angesehen werden müssen oder allgemein für Rotalgen zutreffend sind, müssen weitere Untersuchungen an Rotalgen erweisen.

Von allgemeiner Bedeutung ist die Wirkung von Rifampicin auf den Aufbau neuer plastidärer Ribosomen.

Gelelektrophoretische Auftrennungen der RNA's aus Chlamydomonas und Chlorella haben ergeben, daß mit der Rifampicin-Wirkung die Hemmung der Synthese von 16S- und 23S-ribosomaler RNA verbunden ist (Galling, Salzmann u. Spieß, 1973), wie auch die der 5S-rRNA (Surzycki et al., 1970). Die schon früh geforderte Lokalisation der Gene für plastidäre ribosomale RNA's auf der Chloroplasten-DNA (Scott u. Smillie, 1967) konnte kürzlich nach Sequenzierung der plastidären DNA von Mais durch Restriktions-Endonucleasen direkt nachgewiesen werden (Bedbrook u. Bogorad, 1976). Das Fehlen der Neusynthese dieser Komponenten verursacht daher die Hemmung der Neubildung funktionsfähiger Ribosomen. Zusätzlich fehlen zu deren Aufbau Proteine, deren Gene Plastiden-DNA gebunden sind (siehe Bogorad, 1975 a).

Die Syntheseprodukte plastidärer Ribosomen haben sich aber in Rhodella als unentbehrlich für die Pigmentakkumulation erwiesen. Insofern steht die Frage im Raume, ob die eingeschränkte Regenerationsrate für Chlorophyll und Biliproteide allein dieser Rifampicinwirkung zuzuschreiben ist. Diese Frage kann im Augenblick für Rhodella nicht eindeutig entschieden werden; sie führt aber unmittelbar in die grundsätzlich wichtige Diskussion um die Translatierbarkeit von m-RNA in den verschiedenen proteinbildenden Systemen. Jennings u. Ohad (1972) hielten durch Untersuchungen an Chlamydomonas y-1 in vivo die Translation extraplastidärer RNA an Chloroplastenribosomen für möglich. Bottomley,

Higgins u. Whitfeld (1976) hingegen plädieren nach Studium heterologer Systeme in vitro für eine klare Trennung der prokaryotischen und eukaryotischen Systeme in dem Sinne, daß plastidäre m-RNA ausschließlich im E. coli-System, nucleäre m-RNA hingegen ausschließlich an 80S-Ribosomen eukaryotischer Zellen umgesetzt werden kann.
Entgegen diesen Befunden gelang es Sagher, Grosfeld u. Edelman (1976) mit m-RNAs aus Euglena-Chloroplasten im zellfreien System von Weizenkeimlingen eine deutliche Akkumulation der großen Untereinheit von Fraction-I-Protein zu erzielen und damit die Translatierbarkeit von plastideneigener Information an eukaryotischen Ribosomen zu belegen.
Der inverse Vorgang der Umsetzung nucleärer m-RNA in Organellen kann nach neueren Befunden als unwahrscheinlich gelten. Als mögliche Ursache für eine solche Unterscheidung von Ribosomen durch Nucleinsäuren wurden die sogenannten "Cap"-Strukturen genannt (Bielka, 1977). Dabei handelt es sich um methylierte Nucleotide am 5'-Terminus der m-RNA in Eukaryotenzellen (Rottman, Shatkin u. Perry, 1974). Da diese in Prokaryoten hingegen nicht nachgewiesen worden sind (Shatkin, 1976), könnte hier der Grund dafür liegen, daß Eukaryoten-RNA an Prokaryotenribosomen nicht translatierbar ist.

5. ZUSAMMENFASSUNG

1. Als Ausgangspunkt für das Studium der Pigmentbildung und der Plastidendifferenzierung in der einzelligen Rotalge Rhodella violacea wurden Suspensionen nach 6-tägigem Stickstoffmangel gewählt und diese feinstrukturell und pigmentanalytisch charakterisiert.
   - Die Plastiden der Mangelkultur sind nach Schwund erheblicher Stromaanteile in ihrem Volumen stark reduziert und zeigen nach weitgehendem Verlust der Phycobilisomen durchweg kollabierte Thylakoide unter Ausbildung von Kontaktzonen.
   - - Sie weisen einen Gesamtpigmentgehalt von 30% der Normalkultur auf, und ihre Photosyntheseleistung erreicht nurmehr ca. 25% der Kontrolle.
   - - - Die Atmungskapazität der Mitochondrien der Zellen der N-Mangelkultur dagegen hält sich bis zu diesem Zeitpunkt bei ca. 60% der Kontrolle.

2. Die durch den Stickstoffmangel bedingten feinstrukturellen und biochemischen Veränderungen der Zelle und insbesondere der Plastide konnten nach Überführung der Zellsuspensionen in Vollnährmedium innerhalb von 48 bzw. 72 Stunden nahezu vollständig wieder rückgängig gemacht und die Regeneration in ihrem Ablauf feinstrukturell und pigmentanalytisch erfaßt werden.
   - Feinstrukturell erfolgt nach vermehrter Stromabildung zunächst die Wiederherstellung distinkter Thylakoidmembranen und ihre Neuordnung in äquidistanten Schichten, danach die Regeneration der Phycobilisomen unter Ausbildung ihrer typischen Verteilungsmuster auf den Thylakoidoberflächen.
   - - Innerhalb von 72 Stunden kommt es in etwa zu einer Verdoppelung des Pigmentgehaltes der N-Mangelkultur, während die Photosyntheseleistung überproportional gesteigert den Wert der Kontrolle aufweist. Demgegenüber ist die Regeneration der Hill-Aktivität reduziert, was die Notwendigkeit funktionsfähiger Phycobilisomen für den Energietransfer unterstreicht.

--- Die Atmungskapazität der Mitochondrien erreicht bereits nach 24-stündiger Regeneration den Wert der Normalkultur.

3. Zur Analyse der Beteiligung von cytoplasmaeigenen und plastidären Syntheseprodukten bei der Regeneration der Plastide in Rhodella violacea wurden Inhibitoren vornehmlich der Translation zu Beginn der Regenerationsphase appliziert und der Regenerationsverlauf in Abhängigkeit von der Konzentration feinstrukturell und pigmentanalytisch erfaßt.

Um eventuelle Nebeneffekte von Inhibitoren beurteilen zu können, wurden stets zwei verschiedene Inhibitoren mit ungefähr gleichem Wirkungsort eingesetzt und die Ergebnisse miteinander verglichen; um von vorne herein Nebeneffekte möglichst gering zu halten bzw. zu vermeiden, wurde stets mit der geringsten, gerade noch deutlich wirksamen Konzentration gearbeitet. Für alle Inhibitorversuche wurde die Reversibilität der Hemmung sowie die volle Vitalität der Zellen geprüft. Nur für das spezifisch gebundene Rifampicin konnte dieser Beweis nicht angetreten werden. Parallel durchgeführte Atmungsmessungen dienten der Kontrolle der Funktionsfähigkeit der Mitochondrien.

In Gegenwart von Cycloheximid (1 ug/ml) und MDMP (2,82 ug/ml) werden Chlorophyll a und Biliproteide nicht synthetisiert und Phycobilisomen nicht regeneriert.

- Das Thylakoidsystem bleibt entweder auf dem Stadium kollabierter Thylakoide (MDMP) oder erreicht das eng parallelisierter Thylakoide (Cycloheximid), ohne vorhergehende, deutlich erkennbare Zunahme des Stromas.

-- Die Photosyntheseleistung (ca. 3,5 uM O_2/1,5x10^7 Zellen/Std.) und die Atmungskapazität (ca. o,6 uM O_2/1,5x10^7 Zellen/Std.) bleiben auch nach 72-stündiger Regeneration fast auf dem Niveau der N-Mangelzellen stehen.

Damit ist die grundsätzliche Notwendigkeit der Synthese an Cytoplasmaribosomen sowohl für die Bildung eines normal organisierten Thylakoidsystems als auch für sämtliche Pigmentbildungsprozesse erwiesen.

In Gegenwart von Chloramphenicol(10 ug/ml), Spectinomycin (300 ug/ml) und Lincomycin (300 ug/ml)wird die Chlorophyll- und Biliproteidakkumulation während 72-stündiger Regeneration zwar stark gedrosselt, aber nicht restlos unterdrückt.

- Die Thylakoidregeneration führt nach erheblicher Volumenzunahme der Plastide bis zum Stadium äquidistanter Thylakoidanordnung jedoch ohne Ausbildung von Phycobilisomen.
  Nach Einwirkung von Lincomycin traten in den Plastiden zusätzlich dicht gelagerte, konzentrische Membrananordnungen als Ausdruck lokaler Thylakoiddegeneration auf.
- -- Die Photosyntheseleistung wird trotz geringer Pigmentregeneration deutlich gesteigert. Hohe Werte für die Atmung in Gegenwart insbesondere von Chloramphenicol, aber auch von Lincomycin und Spectinomycin sprechen für die Funktionstüchtigkeit der Mitochondrien.

Wenn somit die Ausschaltung der plastideneigenen Ribosomen insgesamt geringere Ausfallserscheinungen zur Folge hat, so ist die deutliche Hemmung der Biliproteidakkumulation und Phycobilisomenbildung durch Chloramphenicol, Spectinomycin und Lincomycin ein eindeutiger Beleg für die Notwendigkeit auch der plastidären Proteinsynthese bei der Differenzierung des Chloroplasten.

Die kombinierte sukzessive Anwendung von Chloramphenicol und Cycloheximid und der inverse Einsatz liefern Anhaltspunkte für eine dominierende Bedeutung der cytoplasmatischen gegenüber den plastidären Ribosomen für die Pigmentbildung. In keiner Phase der kombinierten Inhibitorexperimente konnten neben der Biliproteidakkumulation spektralphotometrisch freie Phycobiline nachgewiesen werden.

Dies spricht für eine strenge Koppelung von Apoproteinbildung und Chromophorensynthese auch unter diesen Bedingungen.

4. Zur Analyse der Beteiligung der Plastiden-DNA an der Regeneration der Plastide von Rhodella violacea wurde Rifampicin in einem breiten Konzentrationsbereich getestet. In Gegenwart von 200 bis 5 ug/ml Rifampicin liegen die Werte für Chlorophyll und die Biliproteide nach 72-stündiger Regeneration im Mittel bei ca. 20% der Normalregeneration.
   - Feinstrukturell führt die Thylakoidregeneration nach erheblicher Volumenzunahme der Plastide bis zum Stadium äquidistanter Thylakoidanordnung jedoch ohne Ausbildung von Phycobilisomen.
     In Ergänzung zu diesen Effekten und in Übereinstimmung mit

den Befunden nach Lincomycineinsatz traten auch hier regelmäßig lokale Thylakoiddegenerationen auf.
Unter Rifampicinbedingungen ($\geq$ 5 ug/ml) bleibt das Stroma wohl infolge gestörter plastideneigener Syntheseprozesse (Ribosomen, Ribulose -1,5-biphosphat-carboxylase) auffällig kontrastarm.

-- Trotz der weitgehenden feinstrukturellen Wiederherstellung des Thylakoidsystems bleibt in Gegenwart von 250 ug/ml Rifampicin die Photosyntheseleistung auch nach 72-stündiger Regeneration fast auf dem Niveau von N-Mangelzellen. Die Atmungskapazität der Mitochondrien hingegen steigt bei der gleichen Konzentration an.

5. Bei heterotropher Anzucht der N-Mangelzellen in Dunkelheit ist die Synthese von Chlorophyll a völlig blockiert, während der Biliproteidgehalt innerhalb von 72 Stunden deutlich ansteigt.

- Feinstrukturell sind die Plastiden nach 72-stündiger heterotropher Dunkelanzucht durch ein völlig intaktes Thylakoidsystem in äquidistanter Anordnung unter Ausbildung von Phycobilisomen in typischer Größe und Verteilung ausgezeichnet. Licht kann daher für den Vorgang der Biliproteidbildung, -aggregation zum Phycobilisom und deren Kopplung an die Thylakoidmembranen für den betrachteten Zeitraum von 72 Stunden als nicht ausschlaggebend angesehen werden.

-- Fluoreszenzemissionsspektren belegen die Fähigkeit der neugebildeten Phycobilisomen zu effektivem Energietransfer.

--- Die photosynthetische Sauerstoffentwicklung dunkelregenerierter Zellen erreicht mit 5,8 uM 0_2/ $1{,}5 \times 10^7$ Zellen/Std. einen Wert, der doppelt so hoch liegt wie der von N-Mangelzellen.

6. LITERATURVERZEICHNIS

Aach, H.G., Über Abbau und Regeneration der Chloroplastenfarbstoffe bei Chlorella
Arch. Mikrobiol. 19, 166-173 (1953)

Airth, R.L., Blinks, L.R., A new phycoerythrin from Porphyra naidum
Biol. Bull. 111, 321-327 (1956)

Allen, M.B., Arnon, D.J., Studies on nitrogen-fixing blue-green algae. I. Growth and nitrogen fixation by Anabaena cylindrica Lemm.
Plant Physiol. 30, 366-372 (1955)

Allen, M.M., Smith, A.J., Nitrogen chlorosis in blue-green algae
Arch. Mikrobiol. 69, 114-120 (1969)

Armstrong, J.J., Surzycki, S.J., Moll, B., Levine, R.P., Genetic transcription and translation specifying chloroplast components in Chlamydomonas reinhardi
Biochemistry 10, 692-701 (1971)

Baliga, B.S., Cohen, S.A., Munro, H.N., Effect of cycloheximide on the reaction of puromycin with polysome-bound pepdidyl-tRNA
FEBS Lett. 8, 249-252 (1970)

Bar-Nun, S., Ohad, J., Presence of polypeptides of cytoplasmic and chloroplastic origin in isolated photoactive preparations of photosystem I and II in Chlamydomonas reinhardi Y-1
Plant Physiol. 59, 161-166 (1977)

Baxter, R., Knell, V.C., Somerville, H.J., Swain, H.M., Weeks, D.P., Effect of MDMP on protein synthesis in Wheat and Bacteria
Nature New Biol. 243, 139-142 (1973)

Beattie, D.S., Basford, R.E., Koritz, S.B., The inner membrane as the site of the in vitro incorporation of L-(^{14}C) leucine into mitochondrial protein
Biochemistry 6, 3099-3106 (1967)

Bedbrook, J.R., Bogorad, L., Endonuclease recognition sites mapping on Zea mays chloroplast DNA
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 73, 4309-4313 (1976)

Beisenherz, W.W., Schneider, H.A.W., Syntheseort von Enzymen der Chlorophyllbiosynthese
Ber. Deutsch. Bot. Ges. 87, 161-166 (1974)

Bennett, L.L., Ward, V.L., Brockman, R.W., Inhibition of protein synthesis by cycloheximide and related glutarimide antibiotics
Biochim.Biophys.Acta 103, 478-485 (1965)

Bielka, H., Struktur und Funktion der Ribosomen
Biol.Rdsch., Jena 15, 1-16 (1977)

Birdsey, E.C., Lynch, V.H., Utilization of nitrogen compounds by unicellular algae
Science 137, 763-764 (1962)

Bishop, N.J., Mutations of unicellular green algae and their application to the studies on the mechanism of photosynthesis
Record. Chem. Prog. 25, 181-195 (1964)

Blair, G.E., Ellis, R.J., Protein synthesis in chloroplasts.I. Light driven synthesis of the large subunit of Fraction I protein by isolated Pea chloroplasts
Biochim Biophys. Acta 319, 223-234 (1973)

Börner, Th., Schumann, B., Krahnert, S., Pechauf, M., Herrmann, F.H., Knoth, R., Hagemann, R., Struktur und Funktion der genetischen Information in den Plastiden.XIII. Lamellarproteine bleicher Plastiden von Plastom- und Genmutanten von Hordeum und Lycopersicon
Biochem. Physiol. Pflanzen 168, 185-193 (1975)

Bogorad, L., Evolution of organelles and eukaryotic genomes. -Seperation of genes for chloroplast ribosomes in two genomes suggests principles of organelle biology
Science 188, 891-898 (1975 a)

Bogorad, L., Phycobiliproteins and complementary chromatic adaptation
Ann. Rev. Plant Physiol. 26, 369-401 (1975 b)

Bollen, A., Davies, J., Ozaki, M., Mizushima, S., Ribosomal protein conferring sensitivity to the antibiotic spectinomycin in Escherichia coli
Science 165, 85-86 (1969)

Bonen, L., Doolittle, W.F., On the prokaryotic nature of red algal chloroplasts
Proc.Nat.Acad.Sci. USA 72, 2310-2314 (1975)

Boresch, K., Zur Physiologie der Blaualgenfarbstoffe
Lotos (Prag) 58, 344-345 (1910)

Boresch, K., Die Färbung der Cyanophyceen und Chlorophyceen in ihrer Abhängigkeit vom Stickstoffhaushalt des Substrats
Jb. wiss. Bot. 52, 145-185 (1913)

Bottomley, W., Spencer, D., Whitfeld, P.R., Protein synthesis in isolated spinach chloroplasts: Comparison of light-driven and ATP-driven synthesis
Arch. Biochem. 164, 106-117 (1974)

Bottomley, W., Higgins, T.J.V., Whitfeld, P.R., Differential recognition of chloroplast and cytoplasmic messenger RNA by 70S and 80S ribosomal systems
FEBS Lett. 63, 120-124 (1976)

Brown, R.M., Arnott, H.J., Structure and function of the algal pyrenoid. I. Ultrastructure and cytochemistry during zoosporogenesis of Tetracystis excentrica
J. Phycol. 6, 14-22 (1970)

Campbell, P.N., Blobel, G., The role of organelles in the chemical modification of the primary translation products of secretory proteins
FEBS Lett. 72, 215-226 (1976)

Celma, M.L., Monro, R.E., Vazquez, D., Substrate and antibiotic binding sites at the peptidyl transferase centre of E. coli ribosomes
FEBS Lett. 6, 273-277 (1970)

Celma, M.L., Monro, R.E., Vazquez, D., Substrate and antibiotic binding sites at the peptidyl transferase centre of E. coli ribosomes: Binding of UACCA-Leu to 50S subunits
FEBS Lett. 13, 247-251 (1971)

Chang, F.N., Sih, C.J., Weisblum, B., Lincomycin, an inhibitor of aminoacyl SRNA binding to ribosomes
Proc.Natl.Acad.Sci. USA 55, 431-438 (1966)

Chayes, F., Determination of relative volume by sectional analysis
Lab. Invest. 14, 987-995 (1965)

Chua, N., Bennoun, P., Thylakoid membrane polypeptides of Chlamydomonas reinhardtii: Wild type and mutant strains deficient in photosystem II reaction center
Proc.Natl.Acad.Sci. USA 72, 2175-2179 (1975)

Chua, N., Matlin, K., Bennoun, P., A chlorophyll-protein complex lacking in photosystem I mutants of Chlamydomonas reinhardtii
J. Cell Biol. 67, 361-377 (1975)

Chua, N., Gillham, N.W., The sites of synthesis of the principal thylakoid membrane polypeptides in Chlamydomonas reinhardtii
J. Cell Biol. 74, 441-452 (1977)

Clendenning, K.A., Ehrmantraut, H.C., Photosynthesis and Hill-reaction by whole Chlorella cells in continuous and flashing light
Arch. Biochem. 29, 387-403 (1950)

Cooper, D., Banthorpe, D.V., Wilkie, D., Modified ribosomes conferring resistance to cycloheximide in mutants of Saccharomyces cerevisiae
J. Mol. Biol. 26, 347-350 (1967)

Czygan, F.C., Sekundärcarotinoide in Grünalgen.I. Chemie, Vorkommen und Faktoren, welche die Bildung dieser Polyene beeinflussen
Arch. Mikrobiol. 61, 81-102 (1968)

Dersch, G., Mineralsalzmangel und Sekundärcarotinoide in Grünalgen
Flora 149, 566-603 (1960)

Dobberstein, B., Blobel, G., Chua, N., In vitro synthesis and processing of a putative precursor for the small subunit of ribulose-1,5-biphosphate carboxylase of Chlamydomonas reinhardtii
Proc.Natl.Acad.Sci. USA 74, 1082-1085 (1977)

Döring, G., Further results on the photoactive chlorophyll aII in photosynthesis
Biochim. Biophys. Acta 376, 274-284 (1975)

Duysens, L.N.M., Transfer of excitation energy in photosynthesis
Doctoral thesis, University of Utrecht, The Netherlands (1952)

Eaglesham, A.R.J., Ellis, R.J., Protein synthesis in chloroplasts. II. Light-driven synthesis of membrane proteins by isolated chloroplasts
Biochim. Biophys. Acta 335, 396-407 (1974)

Eytan, G., Ohad, I., Biogenesis of chloroplast membranes. VI. Cooperation between cytoplasmic and chloroplast ribosomes in the synthesis of photosynthetic lamellar proteins during the greening process in a mutant of Chlamydomonas reinhardi y-1
J. Biol. Chem. 245, 4297-4307 (1970)

Ellis, R.J., Chloramphenicol and uptake of salt in plants
Nature 200, 596-597 (1963)

Ellis, R.J., Chloroplast ribosomes: Stereospecificity of inhibition by chloramphenicol
Science 163, 477-478 (1969)

Ellis, R.J., Further similarities between chloroplast and bacterial ribosomes
Planta 91, 329-335 (1970)

Ellis, R.J., Mac Donald, I.R., Specificity of cycloheximide in higher plant systems
Plant Physiol. 46, 227-232 (1970)

Ellis, R.J., Hartley, M.R., Sites of synthesis of chloroplast proteins
Nature New Biology 233, 193-196 (1971)

Ellis, R.J., Inhibition of chloroplast protein synthesis by lincomycin and 2-(4-methyl-2,6-dinitroanilino)-N-methylpropionamide
Phytochemistry 14, 89-93 (1975 a)

Ellis, R.J., Protein synthesis by isolated chloroplasts
Biochim. Biophys. Acta 463, 185-215 (1977)

Ennis, H.L., Lubin, M., Cycloheximide: Aspects of inhibition of protein synthesis in mammalian cells
Science 146, 1474-1476 (1964)

Estabrook, R.W., Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP:O ratios
In: Methods in Enzymology, Vol X, 41-47 (1967), R.W. Estabrook, M.E. Pullman (eds). Acad. Press, New York-London

Evans, L.V., Callow, M.E., Percival, E., Fareed, V., Studies on the synthesis and composition of extracellular mucilage in the unicellular red alga Rhodella
J. Cell Sci. 16, 1-21 (1974)

Frickel-Faulstich, B., Veränderungen im photosynthetischen Elektronentransport einzelliger Grünalgen während des Entwicklungszyklus
Dissertation, Marburg (1974)

Fries, L., On the cultivation of axenic red algae
Physiologia Plantarum 16, 695-708

Fujita, Y., Hattori, A., Formation of phycoerythrin in preilluminated cells of Tolypothrix tenuis with special reference to nitrogen metabolism
Plant Cell Physiol. 1, 281-292 (1960)

Galling, G., Salzmann, C., Spieß, E., Synthese von Chlorophyll und Strukturelementen des Plastiden in Chlorella ohne Beteiligung der Chloroplasten-Ribosomen
Planta 114, 269-284 (1973)

Gantt, E., Conti, S.F., Granules associated with the chloroplast lamellae of Porphyridium cruentum
J. Cell Biol. 29, 423-433 (1966 a)

Gantt, E., Conti, S.F., Phycobiliprotein localization in algae
Brookhaven Symp. Biol. 19, 393-405 (1966 b)

Gantt, E., Edwards, M.R., Conti, S.F., Ultrastructure of Porphyridium aerugineum a blue-green colored Rhodophytan
J. Phycol. 4, 65-71 (1968)

Gergis, M.S., A colorless Chlorella mutant containing thylakoids
Arch. Mikrobiol. 68, 187-190 (1969)

Gimmler, H., Avron, M., On the mechanism of benzoquinone penetration and photoreduction by whole cells
Z. Naturforschg. 26, 585-588 (1971)

Goodenough, U.W., The effects of inhitors of RNA and protein synthesis on chloroplast structure and function in wild type Chlamydomonas reinhardi
J. Cell Biol. 50, 35-49 (1971)

Goodenough, U.W., Levine, R.P., The effects of inhibitors of RNA and protein synthesis on the recovery of chloroplast ribosomes, membrane organization, and photosynthetic electron transport in the ac-20 strain of Chlamydomonas reinhardi
J Cell Biol. 50, 50-62 (1971)

Gorkom van, H.J., Donze, M., Localization of nitrogen fixation in Anabaena
Nature 234, 231-232 (1971)

Griffiths, D.J., The pyrenoid
Botanical Review 36, 29-58 (1970)

Guerin-Dumartrait, E., Leclerc, J.C., Hoarau, J., Effets de la lumière rouge et de la carence en azote sur la composition pigmentaire (phycoérythrine, holochromes chlorophylliens) et l'émission d'O_2 photosynthétique de Porphyridium sp.
Arch. Hydrobiol./Suppl. 39, Algolog. Studies 8, 317-332 (1973)

Gurevitz, M., Kratz, H., Ohad, I., Polypeptides of chloroplastic and cytoplastic origin required for development of photosystem II activity, and chlorophyll protein complexes, in Euglena gracilis chloroplast membranes
Biochim. Biophys. Acta 461, 475-488 (1977)

Hallier, U., Park, R.B., Photosynthetic light reactions in chemically fixed Anacystis nidulans, Chlorella pyrenoidosa und Porphyridium cruentum
Plant Physiol. 44, 535-539 (1969)

Handschin, J., Wunderli, W., Wehrli, W., The binding of rifampicin to RNA polymerase at various transcription steps
Experientia 32, 796-797 (1976)

Hartmann, G., Honikel, K., Knüsel, F., Nüsch, J., The specific inhibition of the DNA-directed RNA synthesis by rifamycin
Biochim. Biophys. Acta 145, 843-844 (1967)

Hattori, A., Fijita, Y., Effect of pre-illumination on the formation of phycobilin pigments in a blue-green alga, Tolypothrix tenuis
J. Biochem. 46, 1259-1261 (1959)

Haxo, F.T., Blinks, L.R., Photosynthetic action spectra of marine algae
J. gen. Physiol. 33, 389-422 (1950)

Haxo, F.T., Norris, P.S., Photosynthetic activity of phycobilans in some red and blue-green algae
Biol. Bull. 105, 374 (1953)

Haxo, F.T., Strout, P., Nitrogen deficiency and coloration in red algae
Biol. Bull. 99, 360 (1950)

Hayward, R.S., DNA-blockade by rifampicin-inactivated E.-coli RNA polymerase and its amelioration by a specific mutation
Eur. J. Biochem. 71, 19-24 (1976)

Heber, U., Vergleichende Untersuchungen an Chloroplasten, die durch Isolierungsoperationen in nicht-wäßrigem und in wäßrigem Milieu erhalten wurden. I. Ermittlung des Verhältnisses von Chloroplastenprotein zum Gesamtprotein der Blattzellen
Z. Naturforschg. 156, 95-99 (1960)

Hoober, J.K., Blobel, G., Characterization of the chloroplastic and cytoplasmic ribosomes of Chlamydomonas reinhardi
J. Mol. Biol. 41, 121-138 (1969)

Hoober, J.K., Siekevitz, P., Palade, G.E., Formation of chloroplast membranes in Chlamydomonas reinhardi y-1. -Effects of inhibitors of protein synthesis
J. Biol. Chem. 10, 2621-2631 (1969)

Hoober, J.K., Sites of synthesis of chloroplast membrane polypeptides in Chlamydomonas reinhardi y-1
J. Biol. Chem. 245, 4327-4334 (1970)

Hoober, J.K., Stegeman, W.J., Control of the synthesis of a major polypeptide of chloroplast membranes in Chlamydomonas reinhardi
J. Cell Biol. 56, 1-12 (1973)

Horak, A., Hill, R.D., Adenosin triphosphatase of Bean plastids.-Its properties and site of formation
Plant Physiol. 49, 365-370 (1972)

Høyer-Hansen, G., Simpson, D.J., Changes in the polypeptide composition of internal membranes of Barley plastids during greening
Carlsberg Res. Commun. 42, 379-389 (1977)

Jennings, R.C., Ohad, I., Biogenesis of chloroplast membranes. XI. Evidence for the translation of extra-chloroplast RNA on chloroplast ribosomes in a mutant of Chlamydomonas reinhardi y-1
Arch. Biochem. Biophys. 153, 79-87 (1972)

Joy, K.W., Ellis, R.J., Protein synthesis in chloroplasts. IV. Polypeptides of the chloroplast envelope
Biochim. Biophys. Acta 378, 143-151 (1975)

Kessler, E., Czygan, F.C., Physiologische und biochemische Beiträge zur Taxonomie der Gattungen Ankistrodesmus und Scenedesmus. I. Hydrogenase, Sekundär-Carotinoide und Gelatine-Verflüssigung
Arch. Mikrobiol. 55, 320-326 (1967)

Kessler, C., Hartmann, G.R., The two effects of rifampicin on the RNA polymerase reaction
Biochem. Biophys. Res. Commun. 74, 50-56 (1977)

Köst, H.P., Rüdiger, W., Chapman, D.J., Abbauversuche und Spektraluntersuchungen an Biliproteiden
Liebigs Ann. Chem. (1975) 1582-1593

Koller, K.P., Wehrmeyer, W., Isolierung und Charakterisierung der Biliproteide von Rhodella violacea (Bangiophycidae)
Arch. Microbiol. 100, 253-270 (1974)

Koller, K.P., Wehrmeyer, W., B-Phycoerythrin from Rhodella violacea. Characterization of two isoproteins
Arch. Microbiol. 104, 255-261 (1975)

Koller, K.P., Wehrmeyer, W., Schneider, H., Isolation and characterization of disc-shaped phycobilisomes from the red alga Rhodella violacea
Arch. Microbiol. 112, 61-67 (1977)

Kowallik, W., Action spectrum for the enhancement of endogenous respiration by light in Chlorella
Plant Physiol. 42, 672-676 (1967)

Kowallik, W., Gaffron, H., Enhancement of respiration and fermentation in algae by blue light
Nature 215, 1038-1040 (1967)

Lau, R.H., Mac Kenzie, M.M., Doolittle, W.F., Phycocyanin synthesis and degradation in the blue-green bacterium Anacystis nidulans
J. Bacteriol. 132, 771-778 (1977)

Lee, S.G., Evans, W.R., Hybrid ribosome formation from E. coli and chloroplast ribosome subunits
Science 173, 241-242 (1971)

Lemasson, C., Tandeau, N. De Marsac, Cohen-Bazire, G., Role of allophycocyanin as a light harvesting pigment in Cyanobacteria
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70, 3130-3133 (1973)

Lessler, M.A., Macro- and micro-oxygen electrode techniques for cell measurement
In: Methods in Cell Physiology, Vol. V, 199-218 (1972), D.M. Prescott (ed.), Acad. Press, New-York-London

Liedvogel, B., Sitte, P., Falk, H., Chromoplasts in the daffodil: fine structure and chemistry
Cytobiologie 12, 155-174 (1976)

Loud, A.V., Barany, W.C., Pack, B.A., Quantitative evaluation of cytoplasmic structures in electron micrographs
Lab. Invest. 14, 996-1008 (1965)

Luft, J.H., Improvements in epoxy resin embedding methods
J. Biophys. and Biochem. Cytol., 9, 409-414 (1961)

Lyttleton, J.W., Isolation of ribosomes from spinach chloroplasts
Exp. Cell Res. 26, 312-317 (1962)

Machold, O., Aurich, O., Sites of synthesis of chloroplast lamellar proteins in Vicia faba
Biochim. Biophys Acta 281, 103-112 (1972)

Machold, O., Simpson, D.J., Høyer-Hansen, G., Correlation between the freeze fracture appearance and polypeptide composition of the thylakoid membranes in Barley
Carlsberg Res. Commun. 42, 499-516 (1977)

Mackender, R.O., Leech, R.W., Isolation of chloroplast envelope membranes
Nature 228, 1347-1348 (1970)

Mackinney, G., Absorption of light by chlorophyll solutions
J. Biol. Chem. 140, 315-322 (1941)

Magnus, W., Schindler, B., Über den Einfluß der Nährsalze auf die Färbung der Oscillarien
Ber. Dtsch. Bot. Ges. 30, 314-320 (1912)

Majak, W., Craigie, J.S., Mc Lachlan, J., Photosynthesis in algae. I. Accumulation products in the Rhodophyceae
Can. J. Bot. 44, 541-549 (1966)

Marsh, R.C., Parmeggiani, A., Requirement of protein S5 and S9 from 30S subunits for the ribosome-dependent GTP ase activity of elongation factor G
Proc.Natl. Acad. Sci. USA 70, 151-155 (1973)

Matson, R.S., Kimura, T., Ferredoxin biosynthesis in Euglena gracilis
Biochim. Biophys. Acta 442, 76-87 (1976)

Mayer, F., Czygan, F.C., Änderungen der Ultrastrukturen in den Grünalgen Ankistrodesmus braunii und Chlorella fusca var. rubescens bei Stickstoffmangel
Planta 86, 175-185 (1969)

Mendiola-Morgenthaler, L.R., Morgenthaler, J.J., Price, C.A., Synthesis of coupling factor CF1 protein by isolated spinach chloroplasts
FEBS Lett. 62, 96-100 (1976)

Metzner, H., Lorenzen, H., Rau, H.J., Senger, H., Untersuchungen zur Synchronisierbarkeit einzelner Pigmentmangelmutanten von Chlorella
Planta 65, 186-194 (1965)

Mörschel, E., Koller, K.P., Wehrmeyer, W., Schneider, H., Biliprotein assembly in the disc-shaped phycobilisomes of Rhodella violacea I. Electron microscopy of phycobilisomes in situ and analysis of their architecture after isolation and negative staining
Cytobiologie 16, 118-129 (1977)

Monro, R.E., Vazquez, D., Ribosome-catalysed peptidyl transfer: Effects of some inhibitors of protein synthesis
J. Mol. Biol. 28, 161-165 (1967)

Morgenthaler, J.J., Mendiola-Morgenthaler, L., Synthesis of soluble, thylakoid, and envelope membrane proteins by spinach chloroplasts purified from gradients
Arch. Biochem. Biophys. 172, 51-58 (1976)

Morrison, M., Steele, W., Danner, D.J., The reaction of benzoquinone with amines and proteins
Arch. Biochem. Biophys. 134, 515-523 (1969)

Nickel, H., Gewicht und Zusammensetzung der Chloroplasten von Antirrhinum majus
Flora Abt.A 159, 233-252 (1968)

Nierhaus, D., Nierhaus, K.H., Identification of the chloramphenicol-binding protein in Escherichia coli ribosomes by partial reconstitution
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 2224-2228 (1973)

Obrig, T.G., Culp, W.J., Mc Keehan, W.L., Hardesty, B., The mechanism by which cycloheximide and related glutarimide antibiotics inhibit peptide synthesis on reticulocyte ribosomes
J. Biol. Chem. 246, 174-181 (1971)

Ohad, I., Biogenesis and modulation of membrane properties in greening Chlamydomonas reinhardi, y-1 cells
In: Methods in Enzymology 32, 865-871 (1974)

Ohki, K., Katoh, T., Incompetence of dark-synthesized phycocyanin in excitation transfer to photosystem II chlorophyll
Planta 129, 249-251 (1976)

Pestka, S., Studies on the formation of transfer ribonucleic acid-ribosome complexes. XI. Antibiotic effects on phenylalanyl-oligonucleotide binding to ribosomes
Proc.Natl.Acad.Sci. USA 64, 709-714 (1969 a)

Pestka, S., Studies on the formation of transfer ribonucleic acid-ribosome complexes. Phenylalanyl-oligonucleotide binding to ribosomes and the mechanism of chloramphenicol action
Biochem. Biophys. Res. Commun. 36, 589-595 (1969 b)

Pestka, S., Rosenfeld, H., Harris, R., Hintikka, H., Studies on transfer ribonucleic acid-ribosome complexes.XXI. Effects of antibiotics on peptidyl-puromycin synthesis by mammalian polyribosomes
J. Biol. Chem. 247, 6895-6900 (1972)

Pickett, J.M., French, C.S., The action spectrum for blue-light-stimulated oxygen uptake in Chlorella
Proc. Natl.Acad. Sci. USA 57, 1587-1593 (1967)

Pongs, O., Bald, R., Erdmann, V.A., Identification of chloramphenicol-binding protein in Escherichia coli ribosomes by affinity labeling
Proc.Natl. Acad. Sci. USA 70, 2229-2233 (1973)

Porter, G., Tredwell, C.J., Searle, G.F.W., Barber, J., Picosecond time-resolved energy transfer in Porphyridium cruentum
Biochim. Biophys. Acta 501, 232-245 (1978)

Rao, S.S., Grollman, A.P., Cycloheximide resistance in yeast: A property of the 60S ribosomal subunit
Biochem. Biophys. Res. Commun. 29, 696-704 (1967)

Rawson, J.R., Stutz, E., Isolation and characterization of Euglena gracilis cytoplasmic and chloroplast ribosomes and their ribosomal RNA components
Biochim. Biophys. Acta 190, 368-380 (1969)

Ridley, S.D., Leech, R.M., Division of chloroplasts in an artificial environment
Nature 227, 463-465 (1970)

Ris, H., Plaut, W., Ultrastructure of DNA-containing areas in the chloroplast of Chlamydomonas
J. Cell Biol. 13, 383-391 (1962)

Röbbelen, G., Untersuchungen an strahleninduzierten Blattfarbmutanten von Arabidopsis thaliana (L.) Heynh.
Z. Vererbungsl. 88, 113-120 (1957)

Ro-Choi, T.S., Raj, N.B.K., Pike, L.M., Busch, H., Effects of α-amanitin, cycloheximide and thioacetamide on low molecular weight nuclear RNA
Biochemistry 15, 3823-3828 (1976)

Rottman, F., Shatkin, A.J., Perry, R.P., Sequences containing methylated nucleotides at the 5' termini of messenger RNA's: Possible implications for processing
Cell 3, 197-199 (1974)

Sagher, D., Grosfeld, H., Edelman, M., Large subunit ribulose-biphosphate carboxylase mRNA from Euglena chloroplasts
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 73, 722-726 (1976)

Saha, S., Ouitrakul, R., Izawa, S., Good, N.E., Electron transport and photophosphorylation in chloroplasts as a function of the electron acceptor
J. Biol. Chem. 246, 3204-3209 (1971)

Schneider, H.A.W., Beisenherz, W.W., Determination of the sites of synthesis of chlorophyll synthesizing enzymes in cell cultures of Nicotiana tabacum
Biochem. Biophys. Res. Commun. 60, 468-473 (1974)

Schrader, L.E., Beevers, L., Hageman, R.H., Differential effects of chloramphenicol on the induction of nitrate and nitrite reductase in green leaf tissue
Biochem Biophys Res. Commun. 26, 14-17 (1967)

Scott, N.S., Smillie, R.M., Evidence for the direction of chloroplast ribosomal RNA synthesis by chloroplast DNA
Biochem. Biophys. Res. Commun. 28, 598-603 (1967)

Sebald, W., Hofstötter, Th., Hacker, D., Bücher, Th., Incorporation of amino acids into mitochondrial protein of the flight muscle of Locusta migratoria in vitro and in vivo in the presence of cycloheximide
FEBS Lett. 2, 177-180 (1969)

Senger, H., Charakterisierung einer Synchronkultur von Scenedesmus obliquus, ihrer potentiellen Photosyntheseleistung und des Photosynthese-Quotienten während des Entwicklungscyclus
Planta 90, 243-266 (1970 a)

Senger, H., Quantenausbeute und unterschiedliches Verhalten der beiden Photosysteme des Photosyntheseapparates während des Entwicklungsablaufes von Scenedesmus obliquus in Synchronkulturen
Planta 92, 327-346 (1970 b)

Shatkin, A.J., Capping of eucaryotic mRNAs
Cell 9, 645-653 (1976)

Shibata, K., Spectrophotometry of translucent biological materials. Opal glass transmission method.
In: Methods of Biochemical Analysis. D. Glick, ed. Interscience Publishers, Inc. New York. 77-109 (1959)

Siegel, M.R., Sisler, H.D., Inhibition of protein synthesis in vitro by cycloheximide
Nature 200, 675-676 (1963)

Siegel, M.R., Sisler, H.D., Site of action of cyloheximide in cells of Saccharomyces pastorianus.III. Further studies on the mechanism of action and the mechanism of resistance in Saccharomyces species
Biochim. Biophys. Acta 103, 558-567 (1965)

Smillie, R.M., Graham, D., Dwyer, M.R., Grieve, A., Tobin, N.F., Evidence for the synthesis in vivo of proteins of the calvin cycle and of the photosynthetic electron-transfer pathway on chloroplast ribosomes
Biochem. Biophys. Res. Commun. 28, 604-610 (1967)

Stempak, J.E., Ward, R.T., An improved staining method for electron microscopy
J. Cell Biol. 22, 697-701 (1964)

Surzycki, S.J., Genetic functions of the chloroplast of Chlamydomonas reinhardi: Effect of rifampin on chloroplast DNA-dependent RNA polymerase
Proc.Natl. Acad. Sci. USA 63, 1327-1334 (1969)

Surzycki, S.J., Goodenough, U.W., Levine, R.P., Armstrong, J.J., Nuclear and chloroplast control of chloroplast structure and function in Chlamydomonas reinhardi
In: Control of organelle development. Symposia of the society for experimental Biologie No.24, 13-37 (1970). Cambridge: University Press.

Timberlake, W.E., Griffin, D.H., Differential effects of analogs of cycloheximide on protein and RNA synthesis in Achlya
Biochim. Biophys. Acta 349, 39-46 (1974)

Troxler, R.F., Bogorad, L., Studies on the formation of phycocyanin, porphyrins, and a blue phycobilin by wild type and mutant strains of Cyanidium caldarium
Plant Physiol. 41, 491-499 (1966)

Troxler, R.F., Brown, A., Biosynthesis of phycocyanin in vivo
Biochim. Biophys. Acta 215, 503-511 (1970)

Troxler, R.F., Synthesis of bile pigments in plants. Formation of carbon monoxide and phycocyanobilin in wild type and mutant strains of the alga, Cyanidium caldarium
Biochemistry 11, 4235-4242 (1972)

Troxler, R.F., Dokos, J.M., Formation of carbon monoxide and bile pigment in red and blue-green algae
Plant Physiol. 51, 72-75 (1973)

Troxler, R.F., Brown, A.S., Metabolism of δ-aminolevulinic acid in red and blue-green algae
Plant Physiol. 55, 463-467 (1975)

Vasconcelos, A.C., Synthesis of proteins by isolated Euglena gracilis chloroplasts
Plant Physiol. 58, 719-721 (1976)

Vazquez, D., Antibiotics which affect protein synthesis: The uptake of ^{14}C-chloramphenicol by bacteria
Biochem. Biophys. Res. Commun. 12, 409-413 (1964)

Vazquez, D., Antibiotics affecting chloramphenicol uptake by bacteria. Their effect on amino acid incorporation in a cell-free system
Biochim.Biophys. Acta 114, 289-295 (1966)

Venkatesan, N., Mechanism of inhibition of DNA synthesis by cycloheximide in Balb N3T3 cells
Biochim. Biophys. Acta 478, 437-453 (1977)

Weber, A., Chlorophylle und Carotinoide der Chaetophorineae (Chlorophyceae; Ulotrichales).2. Der Einfluß unterschiedlicher Stickstoffkonzentrationen auf die Pigmentgarnitur und die Morphogenese der Grünalge Fritschiella tuberosa Iyengar
Arch. Microbiol. 102, 45-52 (1975)

Weeks, D.P., Baxter, R., Specific inhibition of peptide-chain initiation by 2-(4-methyl-2,6-dinitroanilino)-N-methylpropionamide
Biochemistry 11, 3060-3064 (1972)

Wehrli, W., Knüsel, F., Schmid, K., Staehelin, M., Interaction of rifamycin with bacterial RNA polymerase
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 61, 667-673 (1968)

Wehrli, W., Kinetic studies of the interaction between rifampicin and DNA-dependent RNA polymerase of E. coli
European J. Biochem. 80, 325-330 (1977)

Wehrmeyer, W., Morphologie u. Morphogenese der Plastiden (Chloroplasten)
3. wissenschaftliche Konferenz der Gesellschaft Deutscher Naturforscher u. Ärzte, Semmering bei Wien 1965, P. Sitte ed., Heidelberg; Springerverlag Berlin Heidelberg New York 1966; 203-226

Wehrmeyer, W., Elektronenmikroskopische Untersuchung zur Feinstruktur von Porphyridium violaceum Kornmann mit Bemerkungen über seine taxonomische Stellung
Arch. Mikrobiol. 75, 121-139 (1971)

Wehrmeyer, W., Schneider, H., Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur reversiblen Veränderung der Chloroplastenfeinstruktur von Rhodella violacea bei Stickstoffmangel
Biochem. Physiol. Pflanzen 168, 519-532 (1975)

Weibel, E.R., Stereological principles for morphometrie in electron microscopic cytology
Internal Rev. Cytology 26, 235-302 (1969)

Wettstein, F.O., Noll, H., Penman, S., Effect of cycloheximide on ribosomal aggregates engaged in protein synthesis in vitro
Biochim. Biophys. Acta 87, 525-528 (1964)

Wiedeman, V.E., The non utilization of Tris as a carbon or nitrogen source in the growth of green algae
Can. J. Bot. 42, 1581-1582 (1964)

Witt, H.T., Coupling of quanta, elctrons, fields, ions and phosphorylation in the functional membrane of photosynthesis
Quater. Rev. of Biophysics 4, 365-477 (1971)

Yarbrough, L.R., Wu, F.Y.H., Wu, C.W., Molecular mechanism of the rifampicin-RNA polymerase interaction
Biochemistry 15, 2669-2676 (1976)

Yokum, C.S., Blinks, L.R., Photosynthetic efficiency of marine plants
J. Gen. Physiol. 38, 1-16 (1954)

Zablen, L.B., Kissil, M.S., Woese, C.R., Buetow, D.E., Phylogenetic origin of the chloroplast and prokaryotic nature of its ribosomal RNA
Proc.Natl. Acad.Sci USA 72, 2418-2422 (1975)

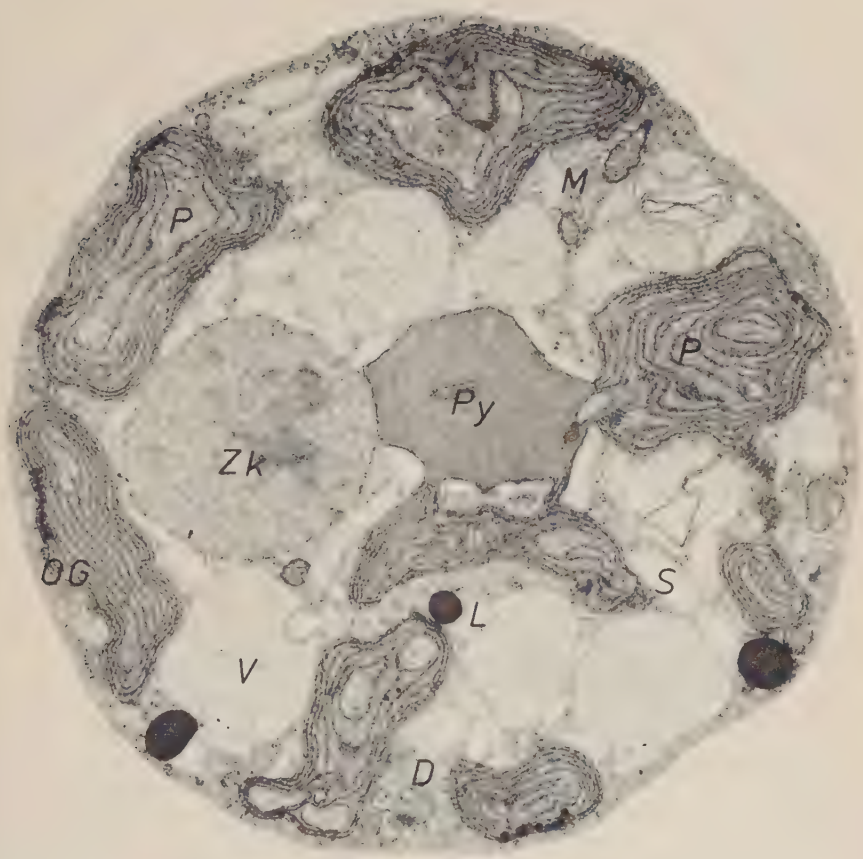
Zucker, M., Stinson jr., H.T., Chloroplasts as the major protein bearing structures in Oenothera leaves
Arch. Biochem. Biophys. 96,637-644 (1962)

7. ANHANG (Elektronenmikroskopische Abbildungen)

Abb.1. Medianer Querschnitt durch die einzellige marine Rotalge Rhodella violacea aus einer Durchströmungskultur in Vollnährmedium.

Abkürzungen: Zellkern Zk, Pyrenoid Py in Kontakt mit Teilen der stark aufgegliederten Plastide P, Stärke S, Dictyosom D, Mitochondrium M, Vakuole V, osmiophile Globuli OG, Lipideinschlüsse L,

Vergrößerung 18 000 fach



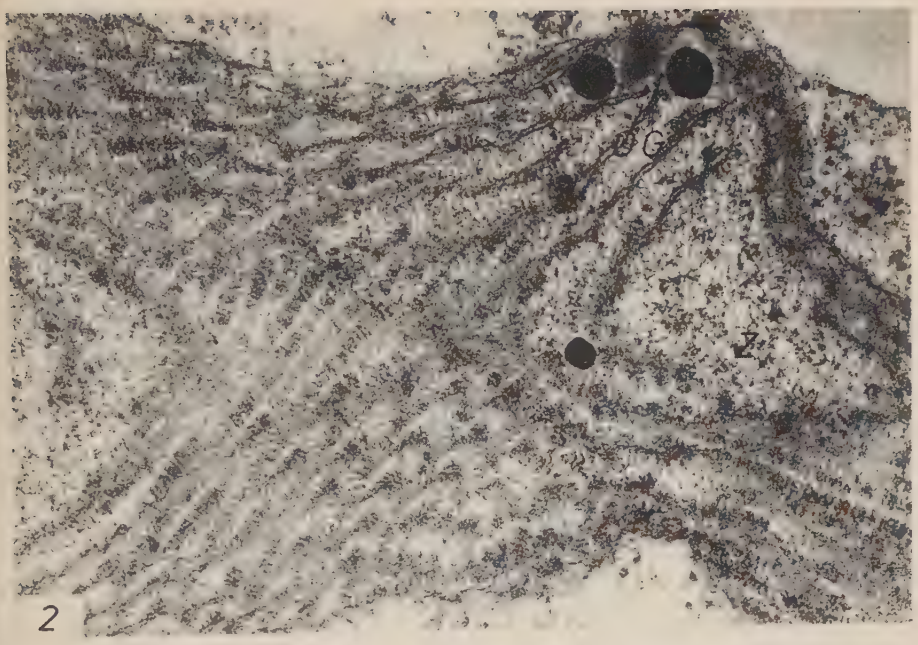
1

Abb.2. Detail einer Plastide bei Schnittführung etwa parallel zur Thylakoidoberfläche. Geldrollenartige Phycobilisomenreihen mit nur geringer Entfernung voneinander auf der Thylakoidmembran angeordnet. Einzelphycobilisomen als distinkte Partikel über größere Flächen hinweg erkennbar.
Am Rande der Plastide osmiophile Globuli sowie ein Plastiden-DNA-Zentrum (Z) mit deutlich fibrillären Elementen.

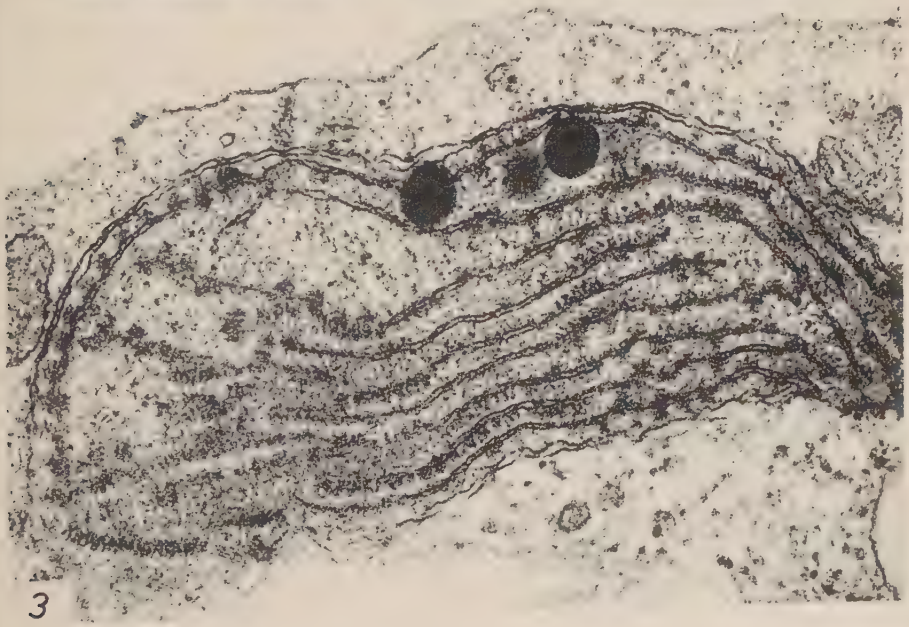
Vergrößerung 91 000 fach

Abb.3. Plastidenteil senkrecht zur Thylakoidoberfläche geschnitten mit Profilansichten der Phycobilisomen, wobei der Kontakt der Scheibchen mit der Membran klar zutage tritt.

Vergrößerung 81 ooo fach



2

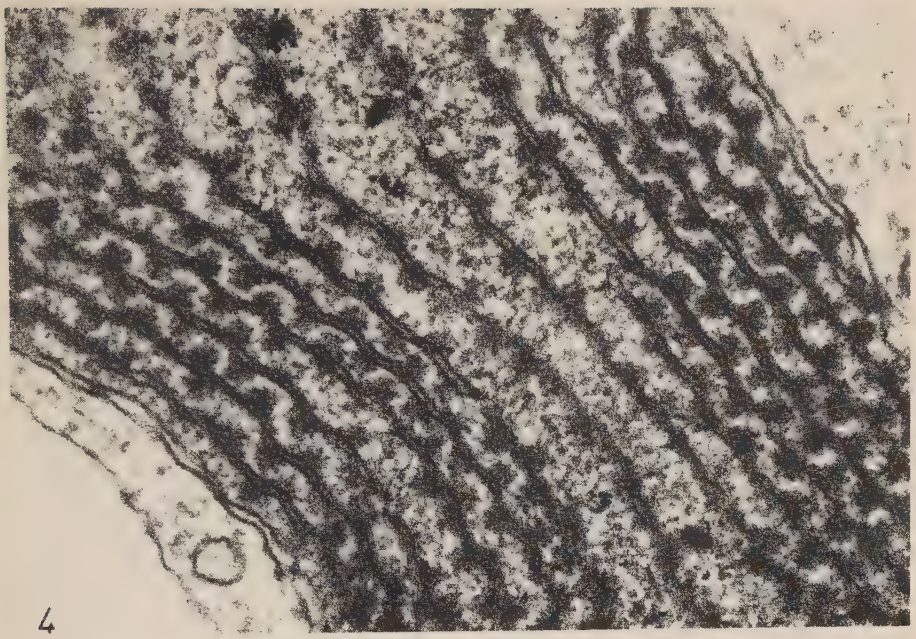


3

Abb.4. Ausschnitt aus einem Chloroplasten senkrecht zur Thylakoidmembran aber parallel zu den Phycobilisomen selbst geschnitten. Phycobilisomen in Flächenansicht halbkreisförmig mit verbreiterter Basis den Membranen aufsitzend. Äußere Begrenzung der Phycobilisomen lappig gegliedert.

Vergrößerung 142 000 fach

Abb.5. Modell des scheibchenförmigen Phycobilisoms von Rhodella violacea, welches die drei charakteristischen Ebenen der obigen Ultradünnschnitte kombiniert (nach Mörschel et al., 1977).

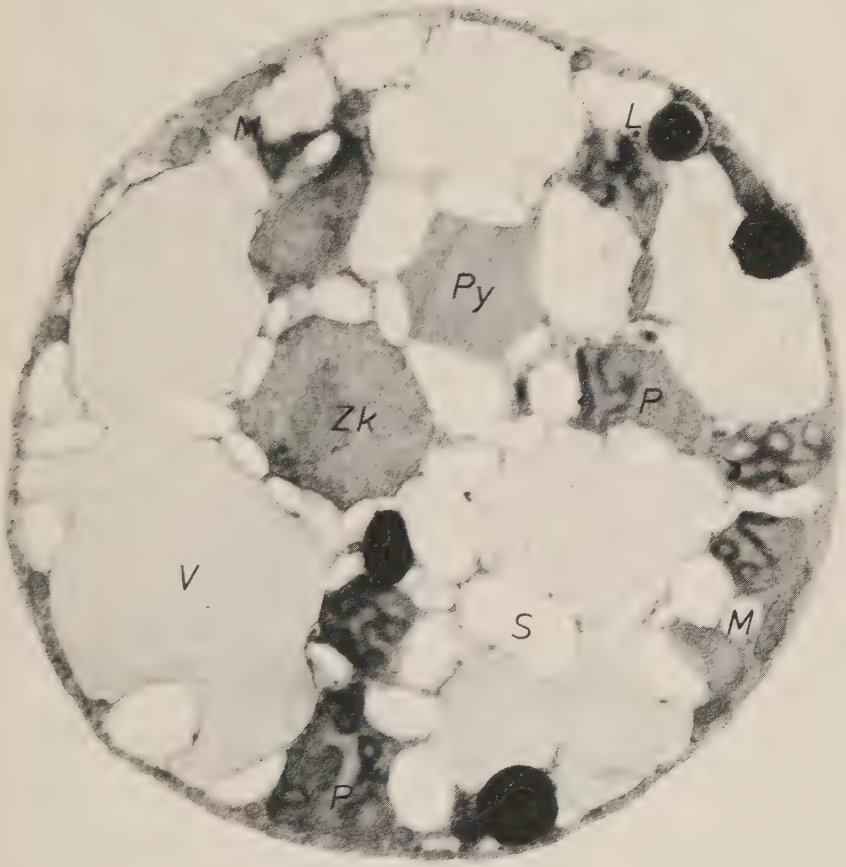


4

5

Abb.6. Medianer Querschnitt durch eine Zelle von Rhodella violacea aus einer Durchströmungskultur nach 6-tägiger Anzucht in N-Mangelmedium.
Plastidenteile flächenmäßig stark reduziert, mit kollabierten Thylakoiden. Starke flächenmäßige Zunahme der Zellsaftvakuolen sowie des Anteils extraplastidärer Rotalgenstärke.

Vergrößerung 18 000 fach



6

Abb.7. Detail des Chloroplasten von Rhodella violacea nach 6-tägiger Anzucht unter N-Mangelbedingungen.

Thylakoide nach Schwund der Phycobilisomen kollabiert und unter räumlicher Verlagerung degeneriert. In manchen Bereichen durch Zusammenlagerung von Membranen Ausbildung von Kontaktzonen.

Vergrößerung 108 000 fach

7

Abb.8. Detail des Chloroplasten nach 6-tägiger Anzucht unter N-Mangelbedingungen.

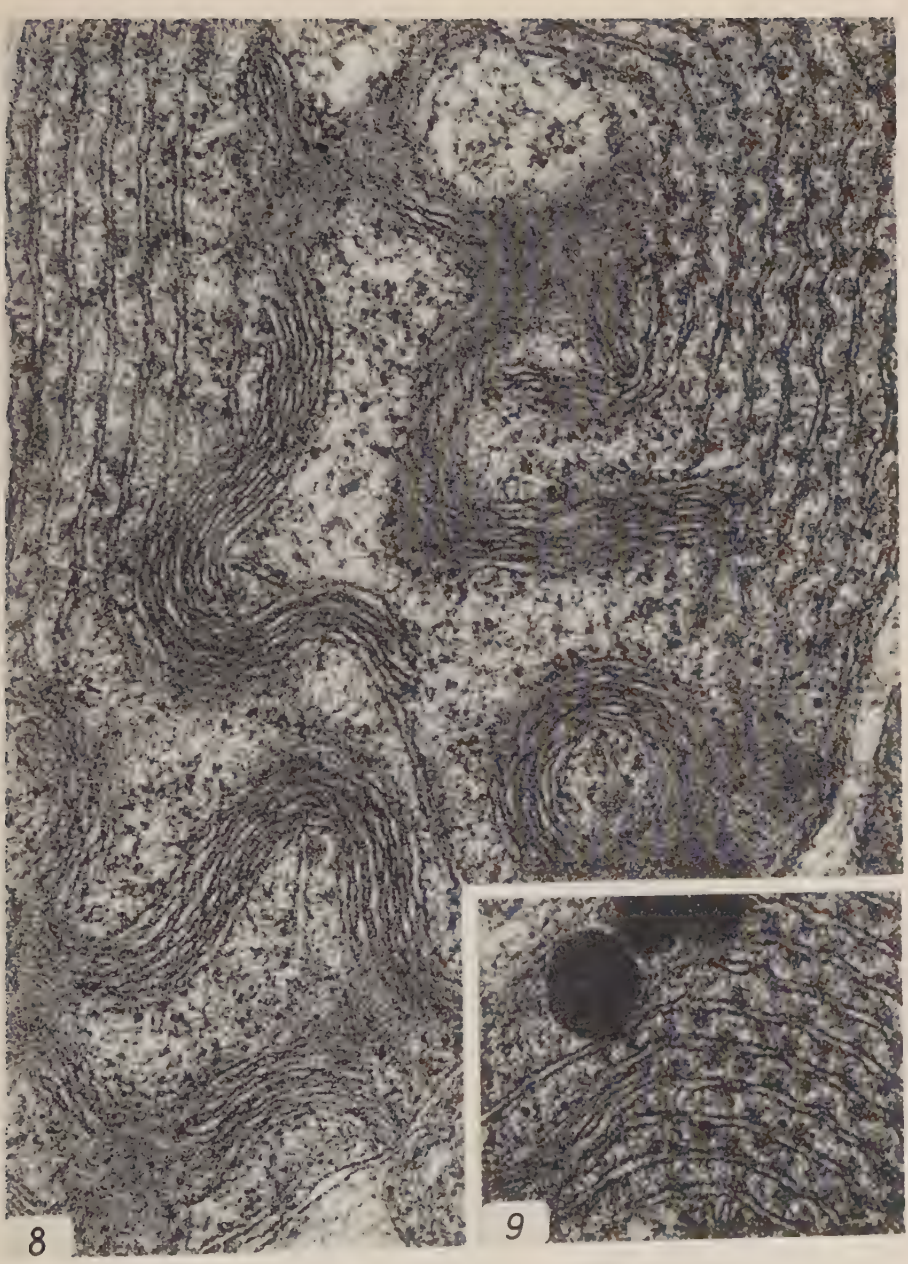
Zentrale Thylakoidlagen sind kollabiert und füllen in wellenförmigem Verlauf die Plastidenmatrix aus. Am Plastidenrand noch lokal normale Membrananordnung mit Phycobilisomenbesatz.

Vergrößerung 125 000 fach

Abb.9. Plastidenteil nach 6-tägiger Anzucht der Zellen in N-Mangelmedium.

In Übergangsbereichen lassen sich Phycobilisomen mit kleinerer Höhe nachweisen.

Vergrößerung 125 000 fach



8

9

Abb.10. Mitochondrium aus einer Zelle nach 6-tägigem N-Mangel. Reichliche Ausbildung an Binnenstrukturen.

Vergrößerung 98 000 fach

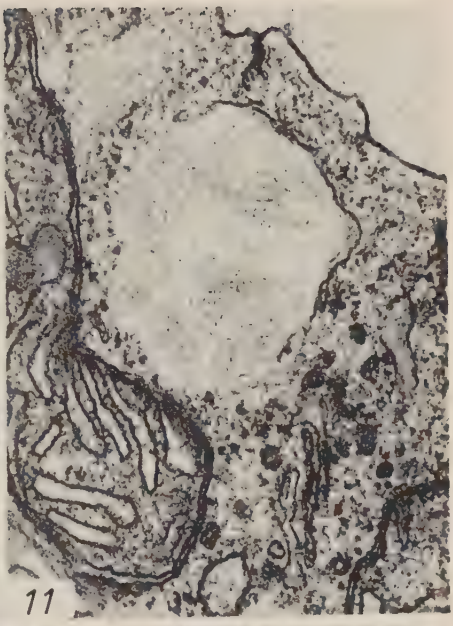
Abb.11. Ausschnitt aus dem randständigen Cytoplasmabelag einer Zelle nach 16-stündiger Regeneration in Vollnährmedium. Dictyosom in aktiver Phase der Sekretion mit materialerfüllten und daher stark elektronenstreuenden Vesikeln. Benachbart eine Vakuole mit fibrillärem Inhalt, welcher der äußeren Schleimhülle gleicht.

Vergrößerung 88 000 fach

Abb.12. Detail eines Chloroplasten nach 8-stündiger Regeneration in Vollnährmedium.
Auflösung der Kontaktzonen der Membranen (⟶).

Vergrößerung 69 000 fach

10



11

12

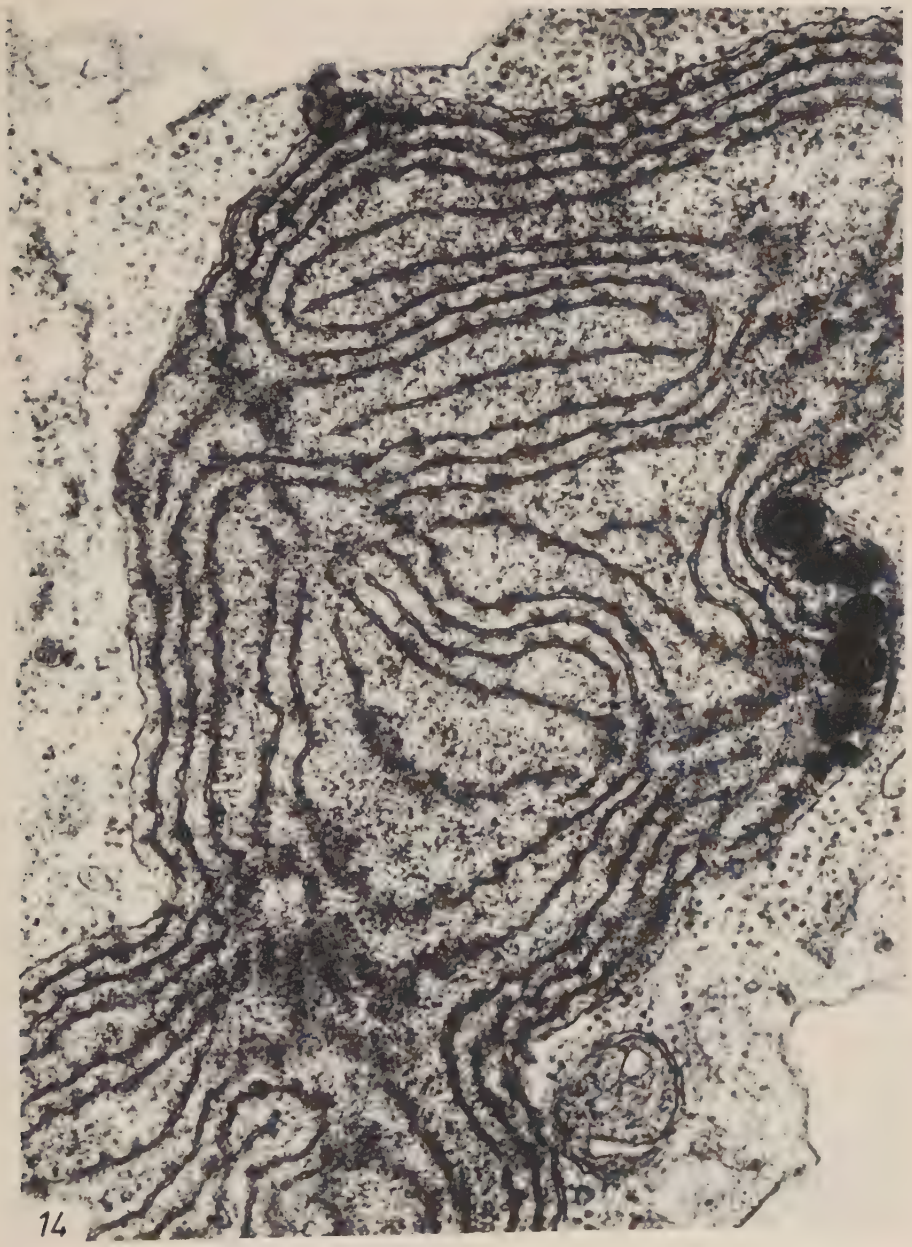
Abb.13. Detail einer Plastide nach 24-stündiger Regeneration in Vollnährmedium mit vollständig entfaltetem Thylakoidsystem. Lokal einzelne kleiner dimensionierte Granula auf den stromaseitigen Thylakoidmembranen nachweisbar (⟶).

Vergrößerung 67 000 fach

13

Abb.14. Plastidendetail nach 48 Stunden Regenerationszeit in Vollnährmedium.
Äquidistante Thylakoide mit Phycobilisomen besetzt.

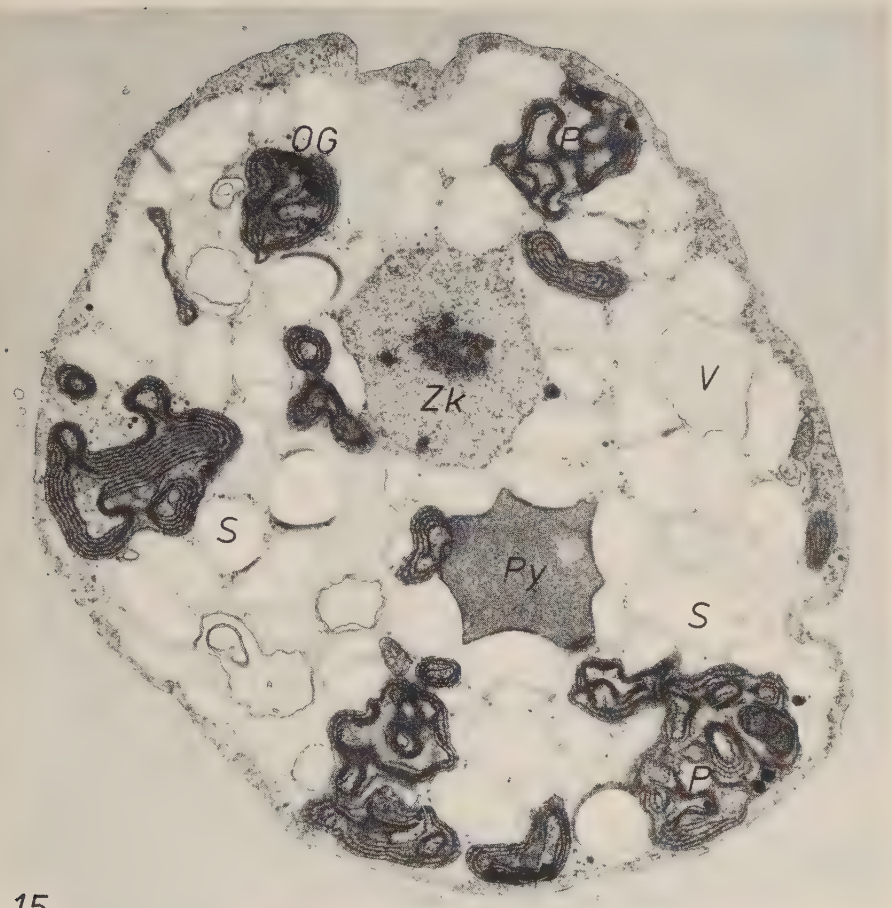
Vergrößerung 83 000 fach



14

Abb.15. Übersicht einer Zelle nach 48-stündiger Regeneration in Vollnährmedium in Anwesenheit von Cycloheximid.

Vergrößerung 15 000 fach



15

Abb.16. Detail eines Chloroplasten nach 48-stündiger Kultur unter Einwirkung von Cycloheximid.

Vergrößerung 66 000 fach

Abb.17. Mitochondrium einer Zelle nach 48 Stunden Einwirkungsdauer von Cycloheximid während der Regeneration.

Vergrößerung 54 000 fach

16

17

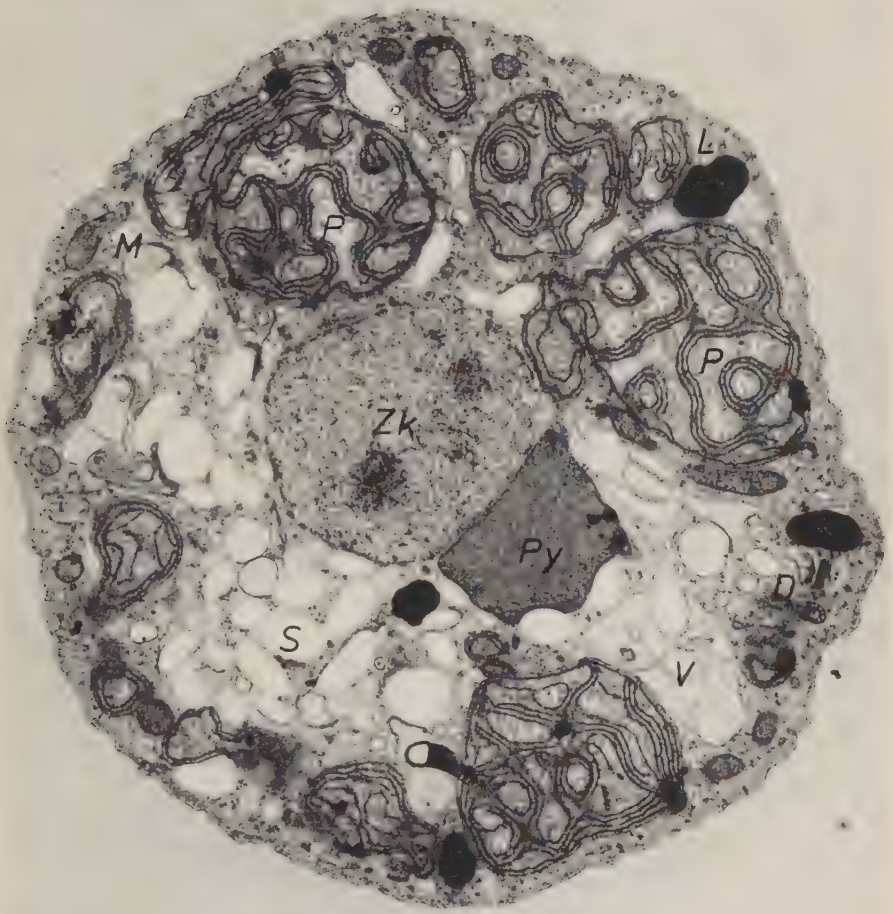
Abb.18. Plastidendetail nach 48-stündiger Einwirkung von D-MDMP auf die Zellen während der Regeneration in Vollnährmedium. Kontaktzonen zwischen kollabierten Thylakoidmembranen noch vorhanden.

Vergrößerung 67 000 fach

18

Abb.19. Medianer Querschnitt durch eine Zelle von Rhodella violacea nach 48-stündiger Anzucht in Vollnährmedium mit Chloramphenicol. Chloroplast flächenmäßig vollständig regeneriert, Thylakoidanordnung der Normalkultur noch nicht erreicht.

Vergrößerung 20 000 fach



19

Abb.20. Detail eines Chloroplasten nach 48-stündiger Behandlung der Zellen mit Chloramphenicol während der Regeneration. Äquidistanter Verlauf der Thylakoidmembranen, aber ohne Phycobilisomenbesatz.

Vergrößerung 62 000 fach

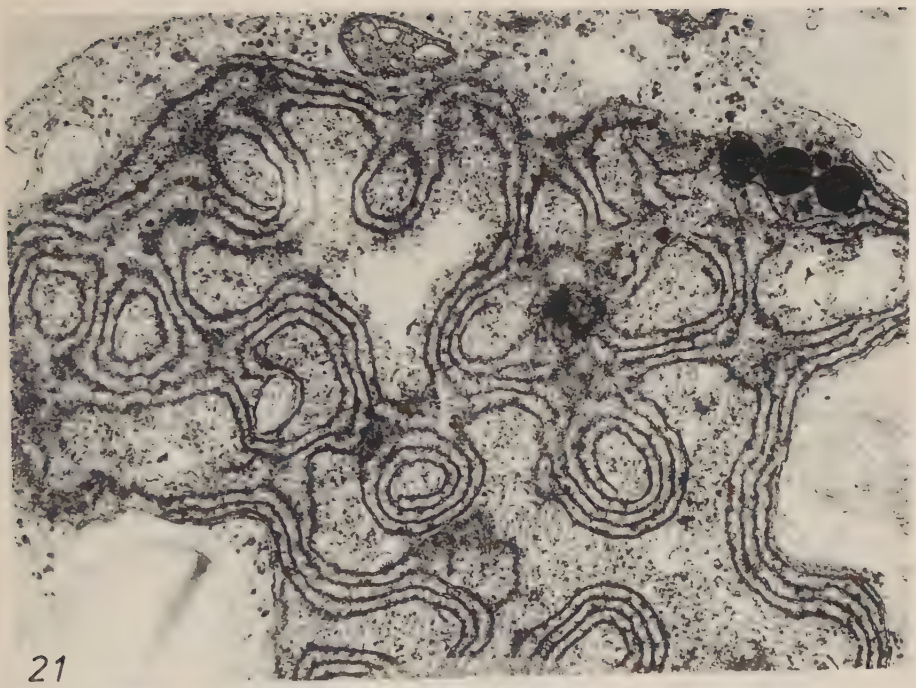
20

Abb.21. 48 Stunden Einwirkungszeit von Spectinomycin auf die regenerierende Kultur nach N-Mangel.
Zentrale Thylakoidlagen voll entfaltet ohne Phycobilisomen.

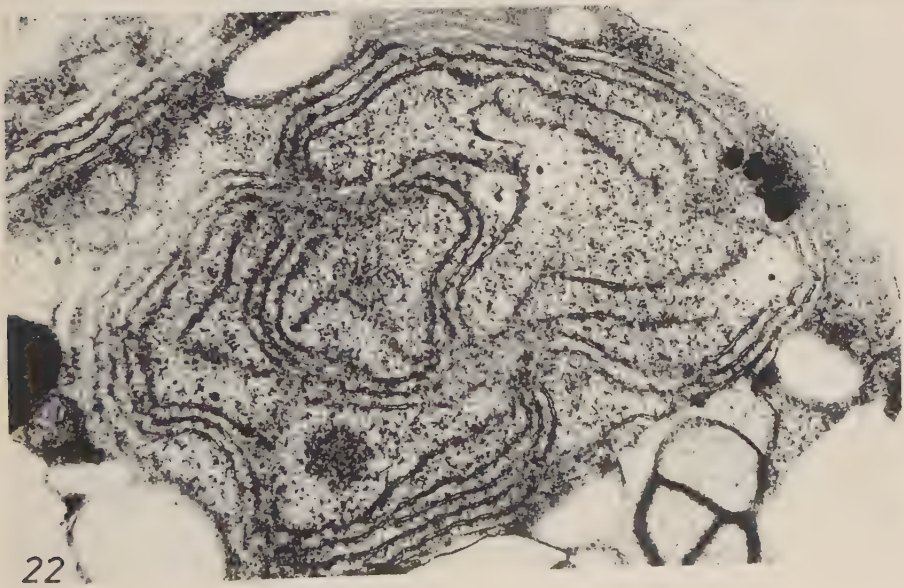
Vergrößerung 39 000 fach

Abb.22. Wellenförmiger Verlauf der zentralen Chloroplastenmembranen nach Anzucht mit Lincomycin während 48 Stunden.

Vergrößerung 39 000 fach



21



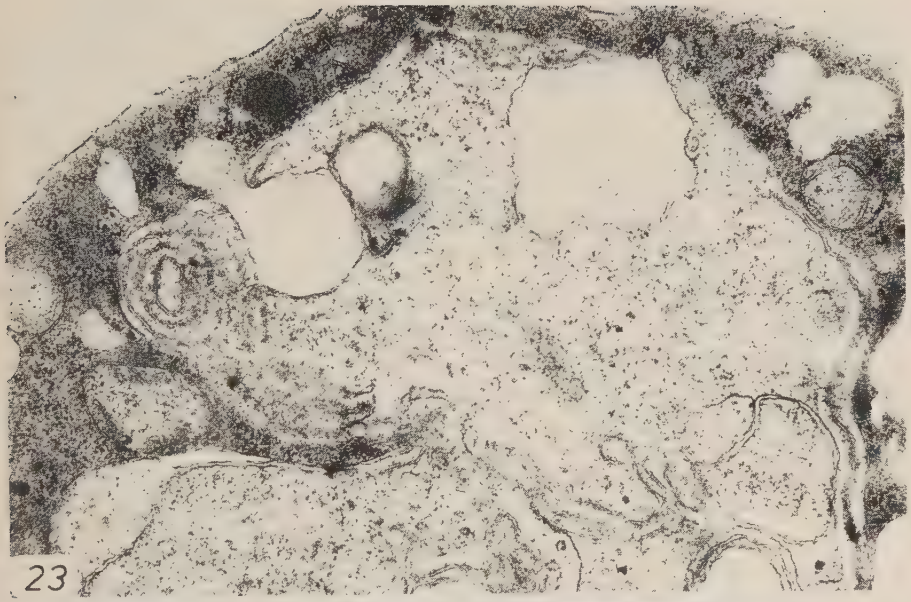
22

Abb.23. Teil eines Chloroplasten nach 48-stündiger Lincomycin-Behandlung während der Regeneration.
Zentraler Matrixbereich frei von Thylakoiden und angefüllt mit granulären Komponenten. Blasenförmige Einstülpungen der Chloroplastenhülle, gefüllt mit fibrillärem Material.

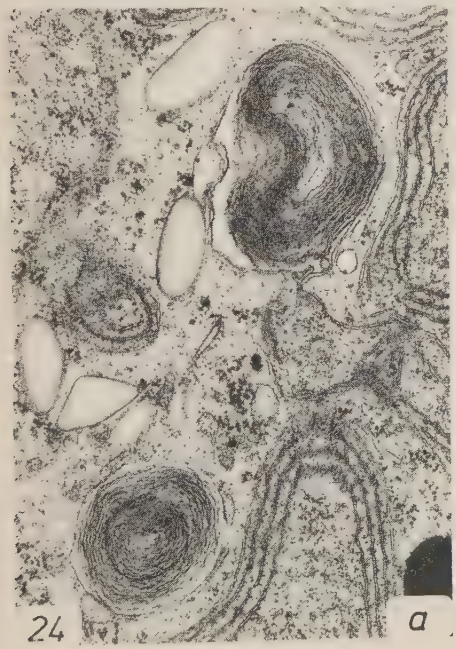
Vergrößerung 39 000 fach

Abb.24. Zellausschnitt nach 48-stündiger Lincomycin-Behandlung während der Regeneration.
Thylakoidmembranen in (a) frühem und (b) fortgeschrittenem Stadium der Degeneration.

Vergrößerung (a) 35 000 fach
(b) 43 000 fach



23



24 a

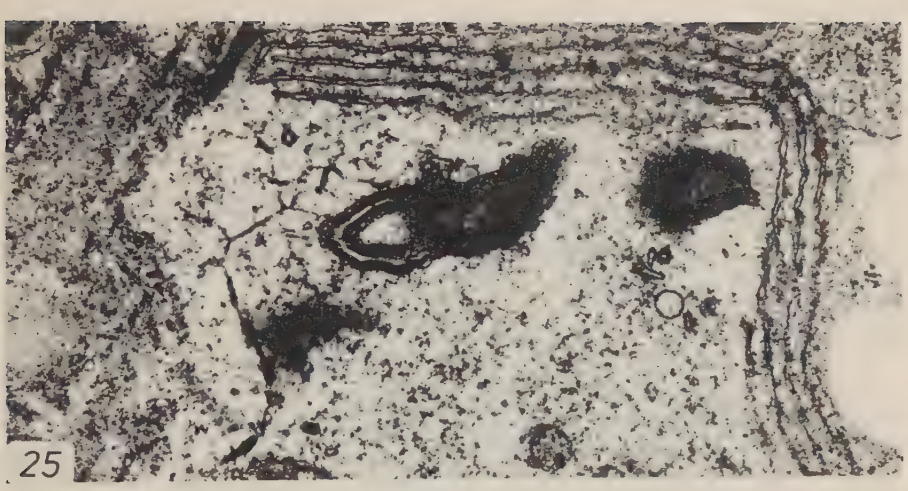
b

Abb.25. Plastidendetail nach Einwirkung von Lincomycin während 48 Stunden.
Vergröberte Darstellung der Plastiden-DNA und lokale Thylakoid-degeneration.

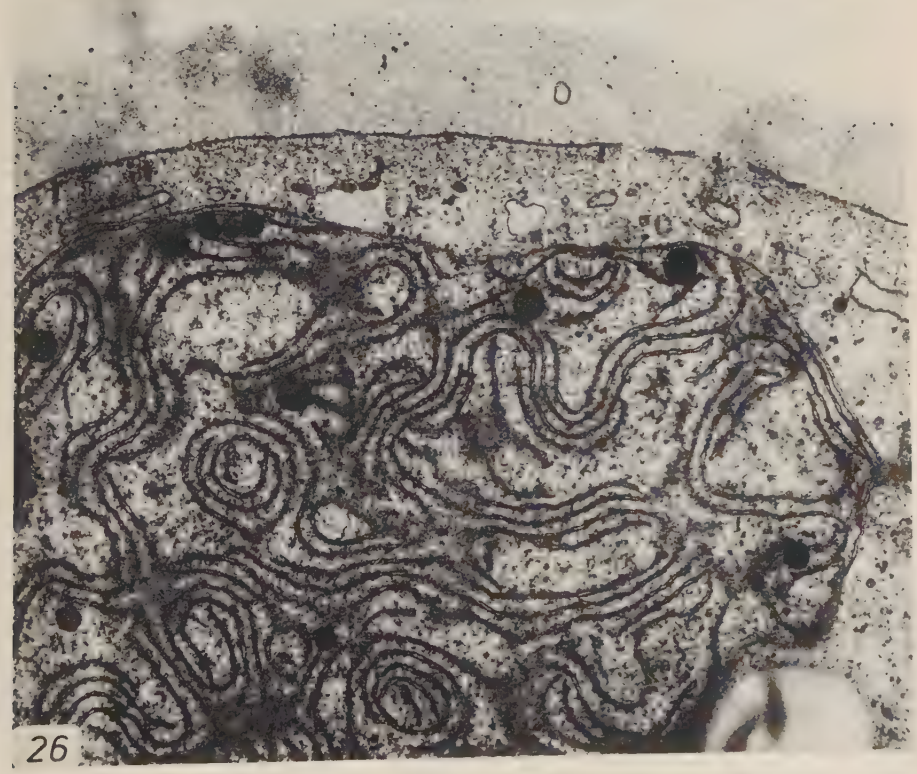
Vergrößerung 57 000 fach

Abb.26. Zellausschnitt nach 72-stündiger Regeneration der Kultur in Anwesenheit von 250 ug/ml Rifampicin.
Anzahl der cytoplasmatischen Ribosomen drastisch reduziert.

Vergrößerung 44 000 fach



25



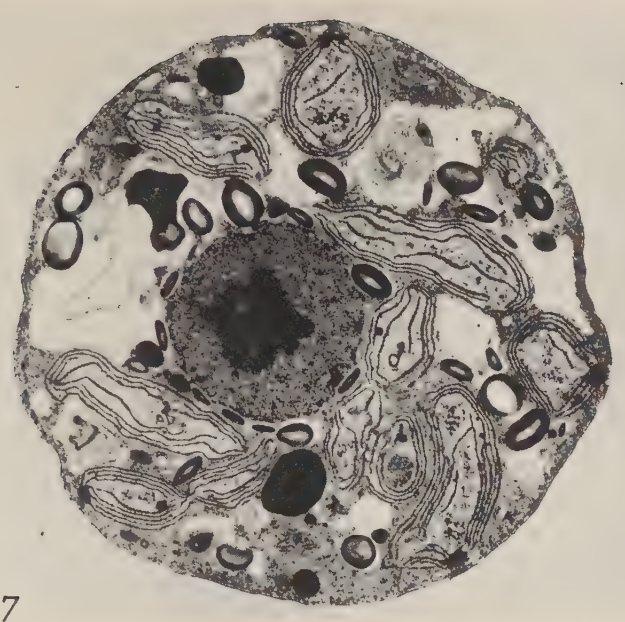
26

Abb.27. Übersicht einer Zelle nach Anzucht mit 5 ug/ml Rifampicin. Gegenüber dem Cytoplasma deutlich gesteigerte Elektronentransparenz der Chloroplasten-Matrix.

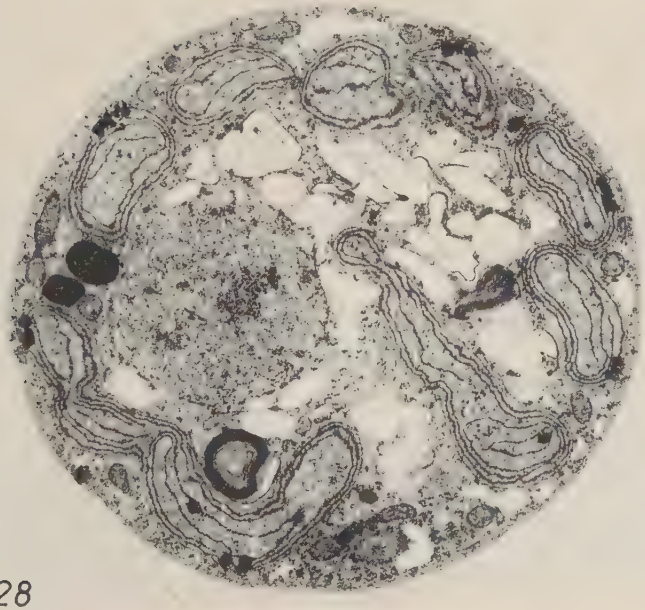
Vergrößerung 12 000 fach

Abb.28. Übersicht einer Zelle nach Anzucht mit 1 ug/ml Rifampicin. Gleichwertiges Kontrastierungsverhalten von Cytoplasma und Chloroplasten-Matrix.

Vergrößerung 14 000 fach



27



28

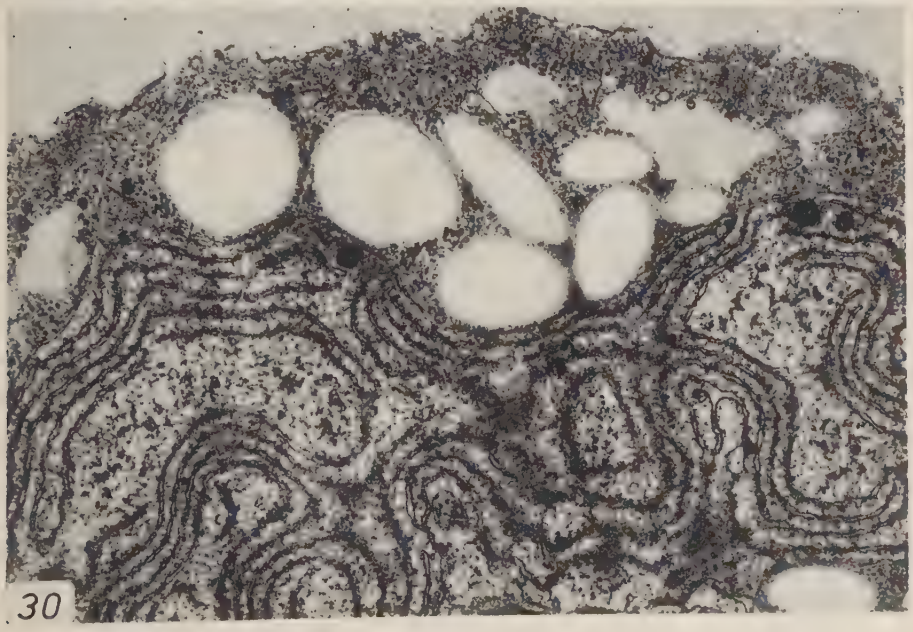
Abb.29. Zellausschnitt nach Anzucht mit 5 ug/ml Rifampicin. Cytoplasma angefüllt mit Ribosomen. Im Chloroplasten hingegen nur geringe Anzahl elektronenstreuender Partikel.

Vergrößerung 43 000 fach

Abb.30. Zellausschnitt nach Anzucht mit 1 ug/ml Rifampicin. Im Cytoplasma Florideenstärke und zahlreiche Ribosomen. Auch im Chloroplasten Vielzahl von kompakten granulären Komponenten.

Vergrößerung 43 000 fach

29



30

Abb.31-33. Mit dem Einsatz von Rifampicin auch in geringen Dosen von 5 ug/ml verbundene Veränderungen im Bereich des Chloroplasten.

Abb.31. Zusammengelagerte Thylakoide im Zentrum der Plastiden-Matrix mit noch vorhandener hoher Integrität (vergl. Abb. 24). In randlichen Bezirken Membranen in üblicher Ordnung.

Vergrößerung 59 000 fach

Abb.32 a-c. Lokale Degeneration von Thylakoidmembranen

a) Thylakoidmembranreste noch sichtbar

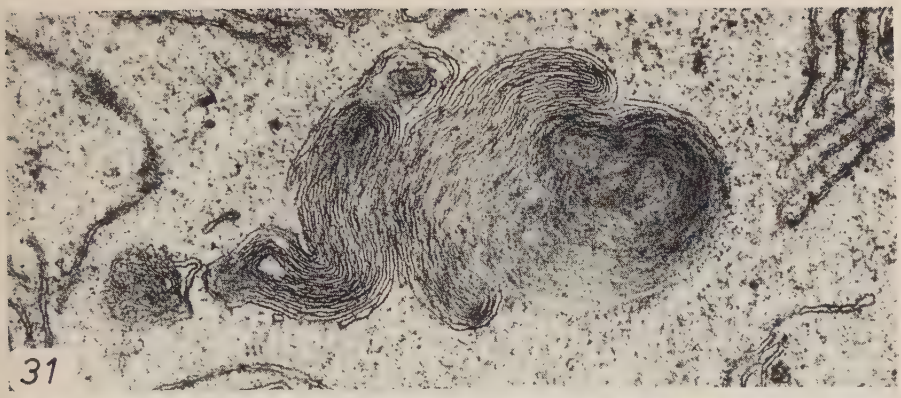
Vergrößerung 51 000 fach

b)-c) Zunehmender Abbau

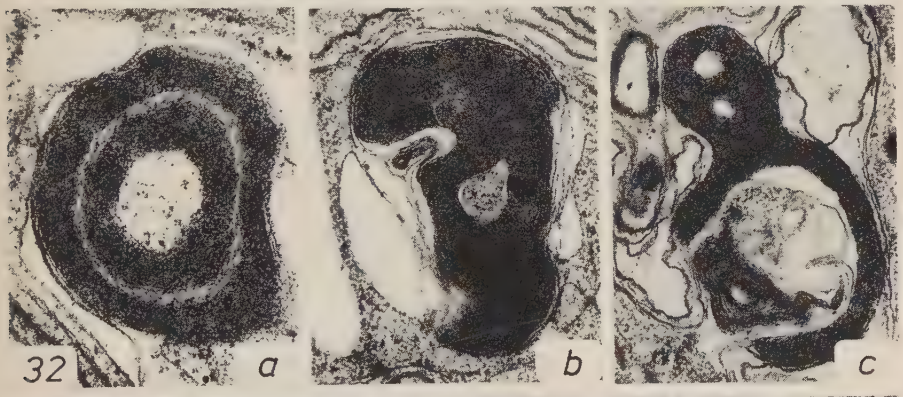
Vergrößerung 42 000 fach

Abb.33. Schnitt durch zwei Plastidenlappen mit normaler Thylakoid-anordnung und Membranerhaltung sowie thylakoidfreiem Bereich, stets von doppelter Hüllmembran umgeben.

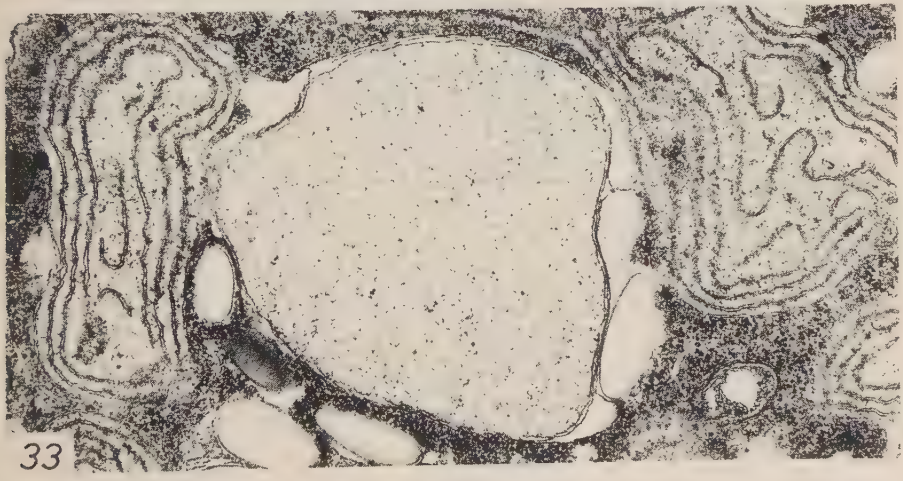
Vergrößerung 39 000 fach



31



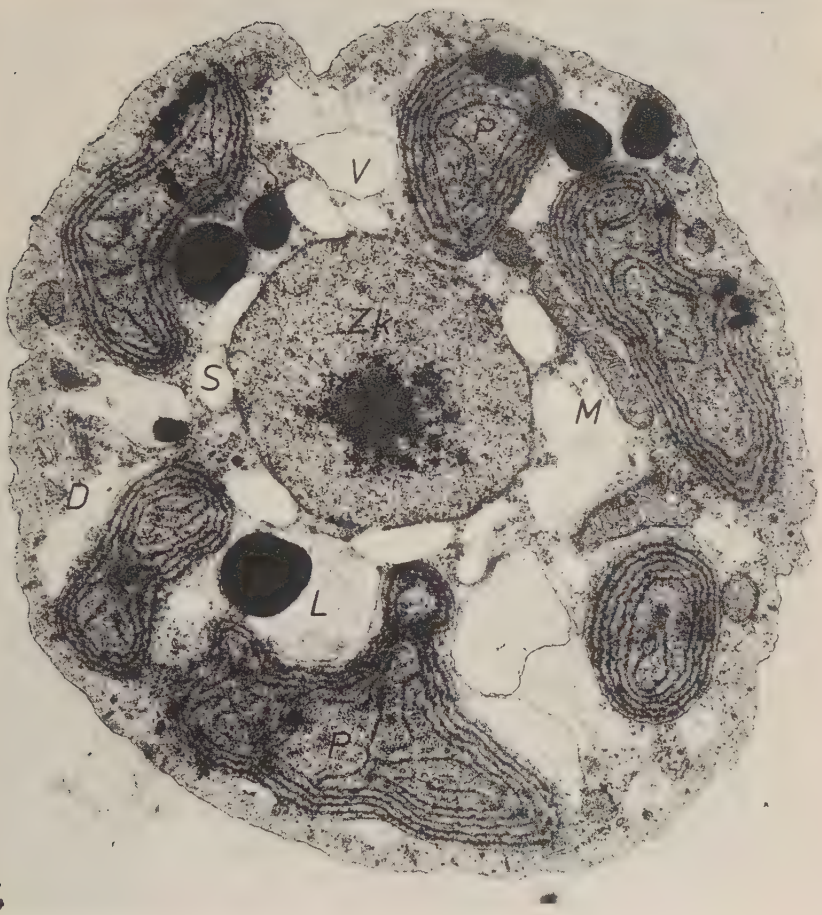
32 a b c



33

Abb.34. Übersicht einer Zelle nach 72-stündiger Anzucht unter heterotrophen Bedingungen.
Vollständige Regeneration der Plastide sowie normale Anordnung der Thylakoidmembranen.

Vergrößerung 24 000 fach

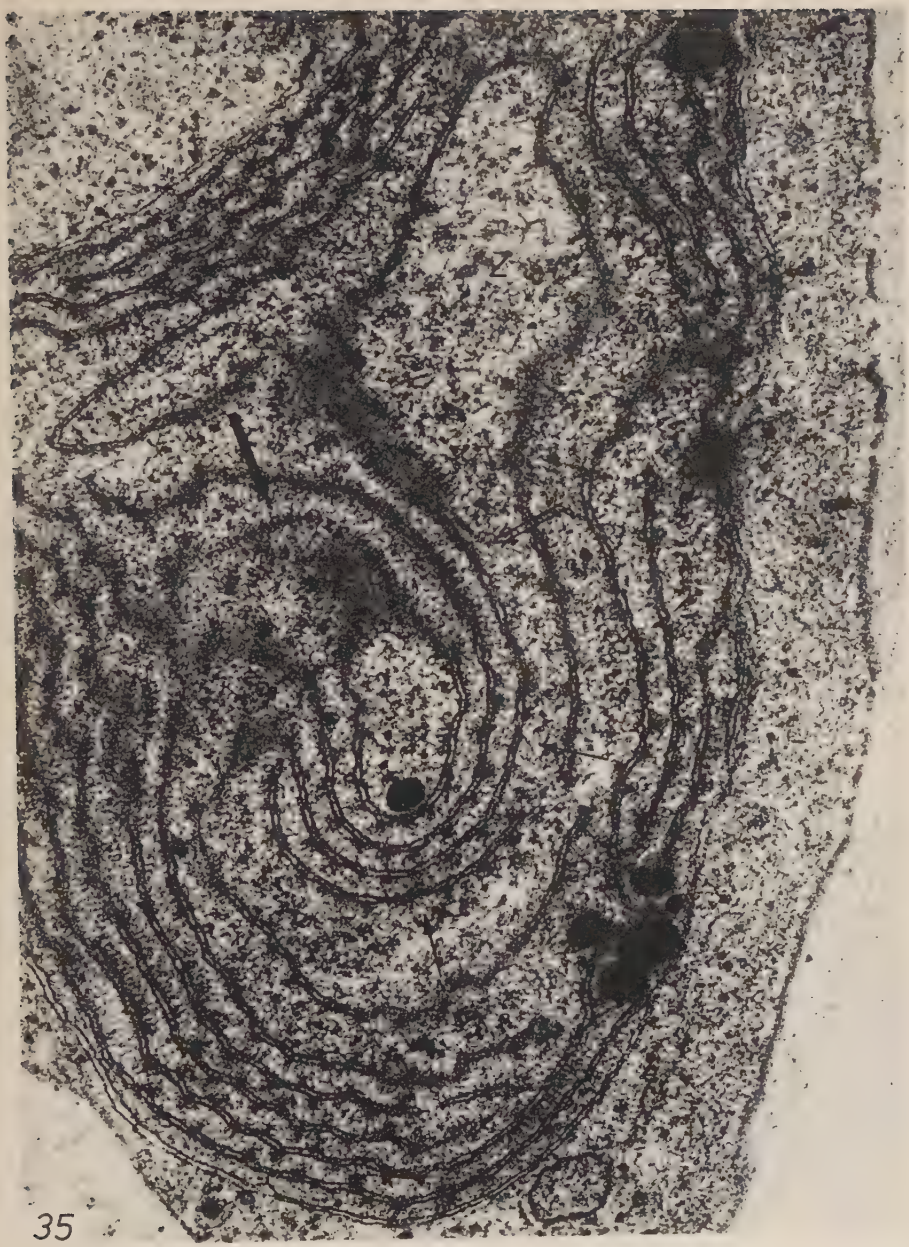


34

Abb.35. Plastidendetail nach 72 Stunden Regeneration in heterotropher Kultur.

Thylakoide vollständig regeneriert und mit Phycobilisomen belegt. Phycobilisomenscheibchen in Flächenansicht (⟶), Profilansicht (⟹) und Aufsicht (➡).

Vergrößerung 97 000 fach



35

Die vorliegende Arbeit entstand im Fachbereich Biologie-Botanik der Philipps-Universität Marburg / Lahn.

Bedanken möchte ich mich bei Frau Renate Kort für die Mithilfe bei der Durchführung einiger Experimente sowie bei den elektronenmikroskopischen Präparationen. Frau Ulrike Kaufer half dankenswerterweise bei der Herstellung von Ultradünnschnitten.
Mein Dank gilt weiter Herrn Erhard Mörschel, der mich in die Bedienung der Elektronenmikroskope einführte, sowie Herrn Klaus-Peter Koller für gute Zusammenarbeit. Auch für die stete kollegiale Hilfsbereitschaft und viele anregende Diskussionen sei Dank gesagt.

Mein Dank gilt ebenfalls:
Frl. Dr. Johanna Knappe für die zeitweise Bereitstellung eines Oxygraphen,
Herrn Dr. Helmut Schreiber für die Hilfe bei der Aufnahme der Fluoreszenzspektren,
sowie meiner Frau Anneliese für das Tippen der Arbeit.

Die Arbeit wurde unterstützt durch Mittel der Deutschen Forschungsgemeinschaft über den Sonderforschungsbereich " Zellenergetik und Zelldifferenzierung " der Universität Marburg, der an dieser Stelle ebenfalls gedankt sei.

LEBENSLAUF

Name:	Schneider
Vorname	Herbert
17.01.1948	geboren in Dreis-Tiefenbach (Kreis Siegen) als Sohn des Oberingenieurs Franz Schneider und seiner Ehefrau Margarethe, geb. Stötzel
1954-1959	Besuch der Volksschule in Dreis-Tiefenbach
1959-1968	Besuch des Fürst-Johann-Moritz-Gymnasiums in Hüttental
1968-1969	Grundwehrdienst bei der Bundeswehr
1969-1975	Studium der Fächer Biologie und Chemie an der Philipps-Universität in Marburg/Lahn
12.04.1972	Zwischenprüfung für das Lehramt an Gymnasien
18.11.1975	Wissenschaftliche Prüfung für das Höhere Lehramt (Staatsexamen)
Seit 1.01. 1976	Wissenschaftlicher Angestellter und Doktorand am Fachbereich Biologie/Botanik der Philipps-Universität in Marburg/Lahn